

MARIA ELISA FAVARIN

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO E ATIVIDADE DA
ENZIMA PAROXONASE EM PACIENTES
HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

**FLORIANÓPOLIS - SC
2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO E ATIVIDADE DA
ENZIMA PAROXONASE EM PACIENTES
HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

MARIA ELISA FAVARIN

**FLORIANÓPOLIS
2004**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais (Donato e Anadir) e irmãos (Eduardo e Solano) que me apóiam na conquista dos meus sonhos.

Ao Prof. Edson Luiz da Silva pelo incentivo, confiança e por seus valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Mario Hiroyuki Hirata do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico da FCF-USP, por ter me dado a oportunidade de desenvolver o trabalho na área de Biologia Molecular

Ao Prof. Carlos Frederico Tourinho do Laboratório de Biologia Molecular da UNISUL, pela confiança e incentivo ao permitir a utilização do seu Laboratório.

A todas as pessoas que concordaram em fazer parte deste estudo contribuindo de maneira anônima para o melhor entendimento dos fatores de risco para aterosclerose. Obrigada!

Muitos foram os amigos e os colegas que, com suas ações e palavras, me incentivaram ao longo destes anos. Não posso me esquecer de nenhum deles. Mas esta é uma tarefa ingrata e assim peço a todos que relevem este lapso e aceitem, em nome destes amigos o meu reconhecimento

À querida amiga Elisangela Catapan, pelo apoio incondicional e por compartilhar comigo alguns dos momentos mais importantes da minha carreira.

Aos meus grandes amigos: Cleidson Valgas, Eduardo Comeli Goulart, Luiz Eduardo Serafim Keller e Paulo Roberto Boff, pelo seu carinho, companheirismo e torcida. Meu sincero agradecimento.

A toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas da UNISUL pelo apoio e incentivo. Muito obrigada.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse à conclusão desta etapa na minha carreira acadêmica.

RESUMO

A aterosclerose é a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo ocidental e envolve interações complexas entre células da parede arterial, células sanguíneas e lipoproteínas plasmáticas. As modificações oxidativas da LDL estão envolvidas na aterogênese e contribuem para a progressão das lesões ateroscleróticas. O efeito protetor da HDL no desenvolvimento da aterosclerose tem sido atribuído ao seu papel no transporte reverso do colesterol, no entanto ela também pode estar envolvida diretamente na proteção da LDL contra a oxidação. O efeito antioxidante da HDL é devido, principalmente, à presença da enzima paroxonase (PON). A atividade da PON humana apresenta variação inter-individual devido ao controle genético e pode estar envolvida na proteção contra eventos aterogênicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição dos polimorfismos genéticos PON1-55, PON1-192 e PON2-311, a atividade enzimática e os efeitos dos polimorfismos na atividade da enzima e no perfil lipídico de 82 indivíduos normocolesterolêmicos e 67 pacientes hipercolesterolêmicos caucasianos. As amostras de sangue foram coletadas após jejum de 12 h e as determinações bioquímicas de colesterol total e frações e triglicerídeos foram realizadas por métodos enzimáticos em analisador automático. O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico pelo método de precipitação salina e a análise dos polimorfismos foi realizada por PCR-RFLP. As atividades arilesterase e paroxonase da PON foram determinadas utilizando os substratos acetato de fenila e paroxon, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas na atividade arilesterase e paroxonase no soro dos participantes dos dois grupos estudados. A frequência dos alelos PON1-55L/M, PON1-192R/Q e PON2-311C/S não apresentou diferença significativa entre pacientes hipercolesterolêmicos e indivíduos do grupo controle. A atividade paroxonase da PON foi menor nos portadores dos genótipos 55MM e 191QQ ($p < 0,001$) em ambos os grupos e apresentou a seguinte ordem crescente de atividade para os genótipos: MM < LM < LL e QQ < QR < RR. Os pacientes hipercolesterolêmicos com os genótipos 55MM e 191QQ também apresentaram a menor atividade arilesterase ($p < 0,05$). Os pacientes hipercolesterolêmicos portadores do genótipo PON2-311CC tiveram menor atividade paroxonase e arilesterase em comparação com os demais genótipos do mesmo grupo e com os indivíduos CC do grupo controle ($p < 0,05$). Os polimorfismos da PON não afetaram o perfil lipídico nos pacientes hipercolesterolêmicos ou nos indivíduos controles. Baseados nesses resultados, podemos concluir que pacientes hipercolesterolêmicos sem manifestações clínicas da aterosclerose não apresentaram diferenças na distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311 da paroxonase, bem como na atividade enzimática em relação aos indivíduos do grupo controle. Os polimorfismos da PON também não afetaram o perfil lipídico dos participantes de ambos os grupos. O achado de menores valores da atividade da paroxonase nos pacientes hipercolesterolêmicos portadores dos genótipos 55 MM, 192 QQ e 311 CC merece futuras investigações para estabelecer a implicação desses resultados com a aterosclerose.

ABSTRACT

EVALUATION OF GENETIC POLYMORPHISM AND PARAOXONASE ACTIVITY IN HYPERCHOLESTEROLEMIC PATIENTS

Atherosclerosis is the main cause of morbidity and mortality in the Western world and involves complex interactions among artery wall cells, blood cells and plasma lipoproteins. The oxidative modifications of LDL are involved in atherogenesis and contribute to the progress of atherosclerotic lesions. The protective effect of HDL in the development of atherosclerosis has been attributed to its role in the reverse transport of cholesterol, but it may also be involved in the protection of LDL against oxidation. The antioxidative effect of HDL is caused mainly by the HDL-associated paraoxonase (PON) enzyme. The human PON activity presents inter-individual variation due to genetic control and may be involved in the protection against atherosclerosis. The goal of this study was to evaluate the genotype distribution and allele frequency of the polymorphisms PON1-55, PON1-192 and PON2-311, the enzyme activity and the effects of the polymorphisms on the enzyme activity and on the lipid profile of 82 normocholesterolemic Caucasian individuals and 67 hypercholesterolemic Caucasian patients. Blood samples (12 h fasting) were withdrawn and the biochemical determinations of total cholesterol, its fractions and triglycerides were made by enzymatic methods in an automatic analyzer. The genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes by the method of saline precipitation and the polymorphisms analysis was made by PCR-RFLP. The arylesterase and paraoxonase activities of the PON were determined using phenylacetate and paraoxon as substrates, respectively. No significant differences were observed between the studied groups in the serum arylesterase and paraoxonase activities. The frequency of the PON1-55L/M, PON1-192R/Q and PON2-311C/S alleles did not show a significant difference between hypercholesterolemic and control groups. The PON paraoxonase activity was smaller in the individuals having 55MM and 191QQ genotypes ($p < 0.001$) in both groups and presented the following activity order for the genotypes: MM < LM < LL and QQ < QR < RR. The hypercholesterolemic patients with the 55MM and 191QQ genotypes also presented a smaller arylesterase activity ($p < 0.05$). The hypercholesterolemic patients having a PON2-311CC genotype had a smaller paraoxonase and arylesterase activity when compared to the other patients and to the CC individuals of the control group ($p < 0.05$). The PON polymorphisms also did not affect the lipid profile of either group. Based on these results we may conclude that hypercholesterolemic patients without clinical signs of atherosclerosis did not have different genotype distribution and allele frequency of the PON1-55, PON1-192 and PON2-311 paraoxonase polymorphisms compared to control subjects. In addition, similar levels of PON activity were found in patients and control subjects. The finding of smaller values of the paraoxonase activity in the hypercholesterolemic patients with the 55 MM, 192 QQ and 311 CC genotypes deserves future investigations to establish its implication in atherogenesis.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Lipídeos, Lipoproteínas e Aterosclerose.....	11
1.2. HDL e Paroxonase (PON).....	15
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Casuística.....	23
3.1.1. Grupo de estudo.....	23
3.1.2. Grupo controle.....	23
3.2. Material.....	24
3.2.1. Amostras biológicas.....	24
3.2.2. Materiais e reagentes.....	24
3.3. Métodos.....	25
3.3.1. Determinações bioquímicas.....	25
3.3.2. Extração do DNA genômico das células sangüíneas periféricas....	25
3.3.2.1. Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico.....	25
3.3.3. Análise dos polimorfismos dos genes 55, 192 e 311 da PON.....	26
3.3.3.1. Reação de restrição dos produtos de PCR.....	28
3.3.3.2. Análise dos fragmentos de restrição.....	28
3.3.4. Controle de Qualidade das análises bioquímicas e moleculares....	29
3.3.5. Atividade Enzimática.....	30
3.3.5.1. Atividade arilesterase da paroxonase no soro total e na HDL.....	30
3.3.5.2. Atividade paroxonase da enzima paroxonase.....	30
3.4. Análise estatística.....	31

4. RESULTADOS.....	32
4.1. Características biodemográficas e perfil lipídico dos indivíduos do grupo controle e pacientes do grupo de estudo.....	32
4.2. Avaliação dos Polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311 do Gene da Paroxonase e Distribuição dos Genótipos e Freqüências Alélicas..	33
4.2.1. Identificação do polimorfismo 55 do gene da PON1 e distribuição dos genótipos.....	33
4.2.2. Identificação do polimorfismo 192 do gene da PON1 e distribuição dos genótipos.....	35
4.2.3. Identificação do polimorfismo 311 do gene da PON2 e distribuição dos genótipos.....	36
4.3 Avaliação da atividade enzimática da paroxonase: Atividades arilesterase e paroxonase.....	37
4.4. Associação entre Polimorfismo e Atividade Enzimática da Paroxonase e entre Polimorfismo e Perfil Lipídico.....	41
4.4.1. Influência do polimorfismo PON1-55 na atividade enzimática e no perfil lipídico.....	41
4.4.2. Influência do polimorfismo PON1-192 na atividade enzimática e no perfil lipídico.....	42
4.4.3. Influência do polimorfismo PON2-311 na atividade enzimática e no perfil lipídico.....	43
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8. ANEXOS.....	72
8.1. Anexo A. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos.....	72
8.2. Anexo B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	73
8.3. Anexo C. Questionário - Avaliação Clínica.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Seqüência de eventos do metabolismo lipídico.....	13
Figura 2. Mecanismos de proteção da PON contra DAC.....	18
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de restrição enzimática com <i>Nla III</i> para a pesquisa do polimorfismo PON1-55	34
Figura 4. Produtos de restrição enzimática com <i>Mbo I</i> para a pesquisa do polimorfismo PON1-192	35
Figura 5. Fragmentos de restrição enzimática com <i>Dde I</i> para a pesquisa do polimorfismo PON2-311	36
Figura 6. Atividade paroxonase e arilesterase da paroxonase no soro de indivíduos do grupo controle e de pacientes hipercolesterolêmicos.....	38
Figura 7. Correlação entre a atividade arilesterase e paroxonase da PON.no soro.....	39
Figura 8. Correlação entre a atividade arilesterase da PON no soro e na HDL isolada.....	39
Figura 9. Correlação entre a atividade arilesterase da PON na HDL isolada e a concentração de HDL-C no soro.....	40
Figura 10. Atividade paroxonase sérica em indivíduos controles e pacientes hipercolesterolêmicos de acordo com o polimorfismo PON1-55.....	42
Figura 11. Atividade paroxonase sérica em indivíduos controles e pacientes hipercolesterolêmicos de acordo com o polimorfismo PON1-192.....	43
Figura 12. Atividade paroxonase sérica em indivíduos controles e pacientes hipercolesterolêmicos de acordo com o polimorfismo PON2-311.....	44

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Seqüências dos iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados para os polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311.....	27
Tabela 1. Dados biodemográficos dos indivíduos do grupo controle e pacientes hipercolesterolêmicos	32
Tabela 2. Perfil lipídico dos indivíduos do grupo controle e pacientes hipercolesterolêmicos	33
Tabela 3. Distribuição dos genótipos e freqüência relativa de alelos para o polimorfismo 55 do gene PON1.....	34
Tabela 4. Distribuição dos genótipos e freqüência relativa de alelos para o polimorfismo 192 do gene PON1	36
Tabela 5. Distribuição dos genótipos e freqüência relativa de alelos para o polimorfismo 311 do gene PON2	37
Tabela 6. Atividade enzimática sérica da PON nos participantes dos grupos controle e de estudo, segundo o hábito de fumar.....	41
Tabela 7. Atividade arilesterase da PON em indivíduos do grupo controle e pacientes hipercolesterolêmicos de acordo com os genótipos dos polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311.....	45
Tabela 8. Concentrações séricas de lipídeos de acordo com os genótipos do polimorfismo PON1-55 nos indivíduos do grupo controle e pacientes do grupo hipercolesterolêmico.....	46
Tabela 9. Concentrações séricas de lipídeos de acordo com os genótipos do polimorfismo PON1-192 nos indivíduos do grupo controle e pacientes do grupo hipercolesterolêmico.....	47
Tabela 10. Concentrações séricas de lipídeos de acordo com os genótipos do polimorfismo PON2-311 nos indivíduos do grupo controle e pacientes do grupo hipercolesterolêmico.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAT	acil-coenzimaA: colesterol aciltransferase
apo A-I	apolipoproteína A-I
apo B-100	apolipoproteína B-100
apo C-II	apolipoproteína C-II
apo E	apolipoproteína E
Bp	pares de bases
CETP	proteína de transferência de ésteres de colesterol
CT	colesterol total
DAC	doença arterial coronariana
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDL-C	colesterol da HDL
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
IAM	infarto agudo do miocárdio
Kb	quilobases
LCAT	lecitina:colesterol aciltransferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	colesterol da LDL
NaF	fluoreto de sódio
NIH	National Institute of Health
PAS	pressão arterial sistêmica
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PON	paroxonase
RFLP	polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
SDS	dodecil sulfato de sódio
TG	triglicerídeos
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
VLDL-C	colesterol da VLDL

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lipídeos, Lipoproteínas e Aterosclerose

Os lipídeos têm um papel importante em praticamente todos os aspectos da vida – servindo como hormônios ou precursores de hormônios, auxiliando na digestão, servindo de armazenamento e de fonte de energia metabólica, agindo como componentes funcionais e estruturais das biomembranas, e formando isolamento para permitir condução nervosa e evitar perda de calor. A relação causal entre os lipídeos e lipoproteínas do plasma e a aterosclerose foi estabelecida na última década. O interesse no metabolismo lipídico e em sua relação com as doenças cardiovasculares nasceu com a identificação dos ateromas, mas somente o aperfeiçoamento de técnicas para o estudo das lipoproteínas permitiu avançar no conhecimento da etiopatogenia e fisiopatologia das dislipidemias e de suas relações com a aterosclerose.

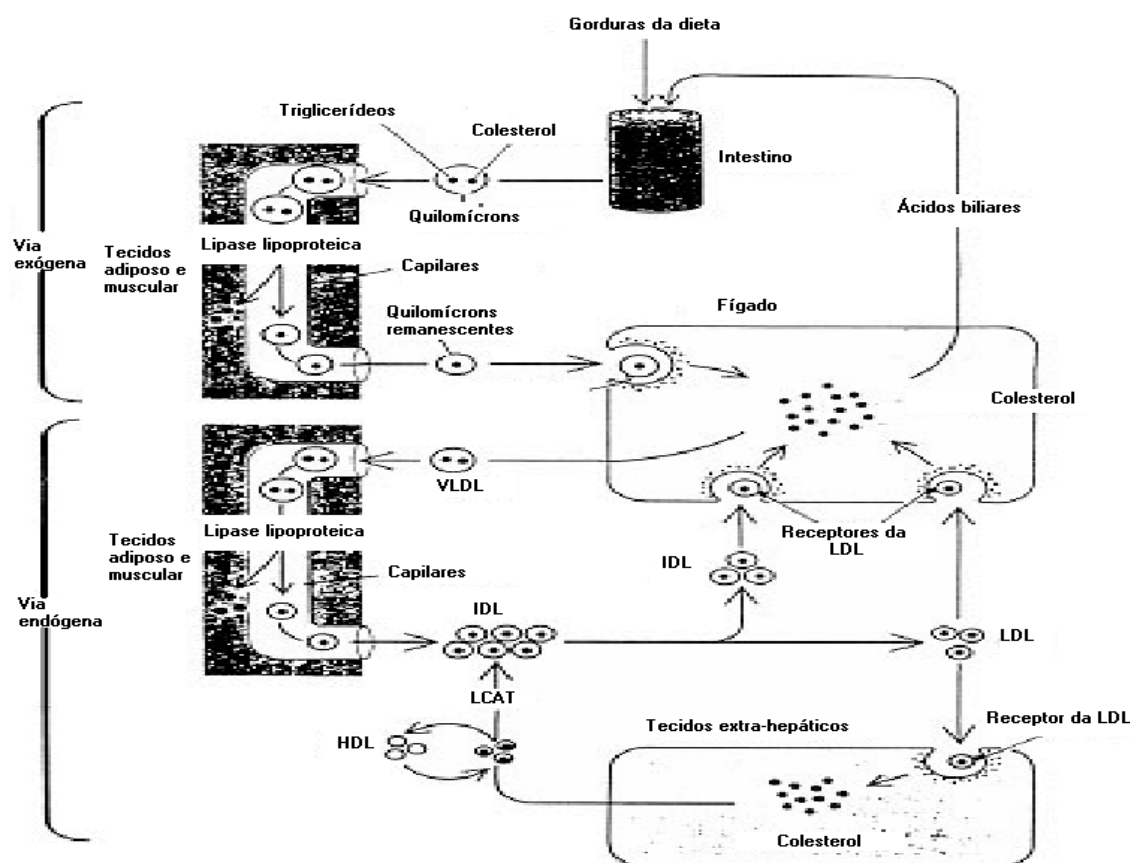
Em 1946, Cohn descreveu a técnica de eletroforese, que separou as lipoproteínas em “alfa e beta lipoproteínas”. Em 1949, Gofman classificou as lipoproteínas pela densidade, por ultracentrifugação analítica, em de muito baixa densidade, VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*), de baixa densidade, LDL (*Low Density Lipoproteins*), e de alta densidade, HDL (*High Density Lipoproteins*). No início dos anos 60, Fredrickson classificou as dislipidemias pelo fenótipo, comparando o padrão eletroforético das lipoproteínas com os respectivos quadros clínicos. Nessa época, estudou-se a importância de mutações genéticas como causa de dislipidemia e, em 1974, Brown e Goldstein identificaram os receptores específicos para as LDL, com a aplicação da genética molecular, inaugurando a época atual. Na área clínica, o Estudo de Framingham, iniciado em 1946, teve grande importância na identificação dos fatores de risco da cardiopatia isquêmica, base das abordagens preventivas atuais. Ao longo desse período, outros estudos epidemiológicos e clínicos também se tornaram clássicos. Todavia, apesar do grande e rápido progresso do conhecimento sobre os aspectos básicos e clínicos do metabolismo lipídico, muitos deles ainda permanecem no campo das hipóteses e outros não são conhecidos (PORTO, 1998).

A LDL tem sua origem no plasma, através do catabolismo da VLDL. O fígado sintetiza e secreta a VLDL na circulação, a qual contém apolipoproteína B-100 como proteína estrutural, é rica em triglicerídeos e relativamente pobre em colesterol esterificado. Na circulação, o metabolismo da VLDL é semelhante ao dos quilomícrons de origem dietética, após aquisição de apo C-II das HDL, e conseqüente ativação da lipase lipoprotéica, os triglicerídeos são hidrolisados com liberação de ácidos graxos livres, os quais são utilizados de imediato como fonte energética pelas células dos tecidos musculares, ou re-esterificados e armazenados no tecido adiposo como triglicerídeos. Nesta fase, grande parte das moléculas de apo A e C e de colesterol livre e fosfolipídeos volta para as HDL, ou dá origem a novas partículas de HDL. As partículas remanescentes, pobres em triglicerídeos e relativamente ricas em colesterol esterificado, são as IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*). Cerca de metade a 2/3 dessas partículas são removidas da circulação pelo fígado através de receptores que reconhecem as apo B-100 e apo E (tipo B/E). O restante das IDL sofre a ação da lipase hepática, sendo transformadas em LDL, as lipoproteínas mais ricas em colesterol esterificado. A LDL fornece colesterol para as células extra-hepáticas e participa do processo de aterosclerose ao se depositar na camada íntima arterial. No interior das células, as LDL são incorporadas aos lisossomas, sofrendo degradação enzimática com liberação de colesterol livre, o qual é utilizado como substrato metabólico ou estrutural, ou é esterificado e armazenado pela ação da enzima acil-coenzima A colesterol aciltransferase (ACAT). A síntese celular de colesterol e dos receptores específicos para LDL (receptor B/E) varia na razão inversa da quantidade de colesterol livre no citoplasma. As células dos tecidos periféricos utilizam o colesterol e o seu excesso é transportado para o fígado pelas HDL, onde é degradado, processo esse conhecido como “transporte reverso do colesterol” (GENSCHEL e SCHMIDT, 2001).

As HDL são lipoproteínas originadas por síntese no fígado, intestino delgado e, principalmente, no plasma em decorrência da ação da lipase lipoprotéica nas lipoproteínas ricas em triglicerídeos (quilomícrons e VLDL). A HDL é composta por fosfolipídeos, colesterol livre, apolipoproteínas A, C, E e triglicerídeos e corresponde a cerca de 25 % do colesterol total circulante (LIBBY, 2001). O transporte reverso do colesterol envolve a hidrólise do éster de colesterol pela colesterol esterase neutra, a translocação do colesterol livre citoplasmático para a membrana celular e retirada do

colesterol livre das membranas plasmáticas das células dos tecidos periféricos, mediada pela apo A-I, presente nas partículas de HDL. No plasma, a enzima lecitina colesterol acil-transferase (LCAT) esterifica o colesterol, que migra para o interior da partícula de HDL e muda a sua forma discóide inicial para a forma esférica, HDL₃, e posteriormente para HDL₂. O colesterol esterificado das HDL₂ pode ser removido pelo fígado por quatro mecanismos: 1) aquisição de apo E pelas HDL e reconhecimento por receptores específicos, embora a quantidade de HDL rica em apo E seja pequena em seres humanos; 2) endocitose das HDL pelo hepatócito através dos receptores SR-B1; 3) captação seletiva dos ésteres de colesterol, podendo ser concomitante à ação da lipase hepática; 4) ação da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), transferindo o colesterol esterificado para as outras lipoproteínas, LDL, IDL, VLDL e quilomícrons, que são removidas por receptores hepáticos (FIELDING e FIELDING, 1995). Ao remover o colesterol depositado nas artérias, as partículas de HDL exercem o seu papel anti-aterosclerótico. A Figura 1 resume as etapas envolvidas no metabolismo lipídico.

Figura 1. Seqüência de eventos do metabolismo lipídico (CHAMPE e HARVEY, 1994)



A aterosclerose é a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo ocidental e envolve interações complexas entre células da parede arterial, células sanguíneas e lipoproteínas plasmáticas. Nos últimos 25 anos, o papel do colesterol nas doenças cardíacas ficou bem demonstrado por meio de estudos clínicos e epidemiológicos, comprovando que a redução dos seus níveis, mais especificamente o colesterol transportado na lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), promove benefícios na diminuição da doença arterial coronariana (PORTO, 1998; TOMAS e cols., 2004).

Segundo as III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose, publicada pelo Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, as dislipidemias podem ser classificadas pela sua etiologia ou laboratorialmente. A classificação etiológica considera dislipidemias primárias (origem genética), secundárias (associadas a doenças, medicamentos e hábitos de vida inadequados) e a classificação de Fredrickson (baseada no fenótipo das lipoproteínas no plasma). A classificação laboratorial compreende: 1) Hipercolesterolemia isolada (aumento de colesterol total e/ou LDL-colesterol); 2)

Hipertrigliceridemia isolada (aumento dos triglicerídeos); 3) Hiperlipidemia mista (aumento do colesterol e dos triglicerídeos); 4) Diminuição isolada do HDL-colesterol ou associada ao aumento dos triglicerídeos ou do LDL-colesterol (SANTOS e cols., 2001).

Inúmeras evidências obtidas dos resultados de estudos clínicos e epidemiológicos, experimentos com animais e estudos *in vitro* demonstram que as modificações oxidativas da LDL são a chave dos eventos da aterogênese precoce e contribuem para o acúmulo de colesterol e oxisteróis na parede arterial, reduzindo a elasticidade e a luz do vaso (AVIRAM e cols., 2000; SENTÍ e cols., 2001). A mais importante complicação clínica dos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) é a oclusão aguda dos vasos coronarianos devido à formação de trombos, resultando no infarto agudo do miocárdio (IAM) (MARTINELLI e cols., 2004). O IAM é uma das formas mais importantes da doença aterosclerótica nos países industrializados, não somente por ser a causa mais comum de morte, como também por incapacitar temporária ou definitivamente um grande número de indivíduos em idade produtiva (PORTO, 1998).

A aterogênese envolve diferentes células, citocinas e fatores de crescimento resultando em lesão endotelial e acúmulo de produtos celulares na camada íntima que, posteriormente, levará ao comprometimento da camada média (DRAGANOV e cols., 2000). São várias as teorias que tentam explicar o desenvolvimento da aterosclerose, entretanto todas elas concordam que a lesão endotelial é o ponto de partida na etiopatogenia deste processo. Inicialmente, a lesão é mínima e sutil, em geral relacionada com fatores hemodinâmicos, não havendo importantes mudanças estruturais, mas favorece o surgimento de uma resposta inflamatória que resulta em aumento da permeabilidade endotelial aos monócitos, lipídeos e plaquetas circulantes (ROSS, 1993). Lipídeos oxidados são encontrados em lesões ateroscleróticas e estão relacionados com a progressão da aterogênese (AVIRAM e cols., 2000). Os mecanismos que promovem a oxidação da LDL *in vivo* são incertos, mas diferentes mecanismos têm sido propostos com bases em evidências *in vitro*. Devido aos vários mecanismos de defesa antioxidante encontrados no plasma, acredita-se que um dos principais locais de oxidação das partículas de LDL seja a parede arterial. Estudos recentes têm demonstrado evidências químicas diretas de que espécies reativas de oxigênio e produtos da enzima mieloperoxidase podem contribuir para as modificações oxidativas na parede arterial de lipídeos e proteínas (HEINECKE e LUSIS, 1998; MERTENS e HOLVOET, 2001). As LDL são depositadas no espaço sub-endotelial e adquirem propriedades pró-inflamatórias e citotóxicas (MACKNESS e DARRINGTON, 1995; SOZMEN e cols., 2001), que

promovem quimiotaxia para monócitos circulantes, os quais, penetrando no endotélio lesado, transformam-se em macrófagos. No espaço sub-endotelial, os macrófagos captam a LDL oxidada através de receptores celulares tipo “*scavenger*”, os quais não são regulados pelo conteúdo intracelular de colesterol. E assim, pelo acúmulo de colesterol os macrófagos se transformam em células espumosas (“*foam cells*”) e ao se agruparem, constituem a estria gordurosa, primeira fase da formação da lesão aterosclerótica (ROSS, 1993; WATSON e cols., 1995; KAPLAN e AVIRAM, 1999; GIUGLIANO, 2000; NAVAB e cols., 2000). Seguindo o acúmulo de colesterol pelos macrófagos e células espumosas, verifica-se também a sua deposição nas células musculares lisas e tecido conjuntivo, formando a placa gordurosa ou ateroma. Os macrófagos secretam fatores quimiotáticos e, na presença de fatores mitogênicos, como fator estimulante de granulócito-monócito, fator de crescimento fibroblástico e a interleucina-1, estimulam a rápida proliferação das células musculares lisas, modificando a lesão, que passa a ser proliferativa e de aspecto fibroso, formando o fibroateroma. A placa aterosclerótica madura passa a conter dois componentes principais, um ateromatoso (rico em lipídeos) e outro esclerótico (rico em colágeno) sintetizado pelas células musculares lisas. Este último é relativamente benigno e, quando predominante, em função do colágeno oferece sustentação à placa e a protege de fissuras ou rupturas, conferindo uma condição “estável”. Já o componente ateromatoso, quando é o principal constituinte, torna-se mais vulnerável e “instável”, e a placa está sujeita a rupturas (KÁDÁR e GLASZ, 2001; LIBBY, 2001).

1.2. HDL e Paroxonase (PON)

Dentre os vários fatores de risco associados à DAC identificados por estudos epidemiológicos, um dos mais importantes é a baixa concentração plasmática de HDL. O efeito protetor da HDL no desenvolvimento da aterosclerose, ou a relação inversa entre os níveis plasmáticos de HDL e a DAC estão bem estabelecidos e têm sido atribuídos ao papel da HDL no transporte reverso do colesterol (GORDON e cols., 1977; GORDON e cols., 1989). No entanto, o efeito protetor da HDL contra a DAC parece não estar relacionado apenas à quantidade de partículas de HDL circulantes. Vários estudos *in vitro* demonstraram que a HDL protege a LDL contra modificações oxidativas (KLIMOV e cols., 1987;

MACKNESS e DURRINGTON, 1995). A partir desses estudos, o efeito antioxidante da HDL emergiu como outra área de interesse e vem sendo acrescentado ao mecanismo protetor da aterosclerose e das enfermidades coronarianas, atribuído à HDL pela sua participação no transporte reverso do colesterol. Nesse aspecto, é importante saber qual a capacidade da HDL em proteger a LDL e as membranas celulares contra os danos causados pela peroxidação lipídica, impedindo potencialmente o início e a progressão da lesão aterosclerótica (PATI e PATI, 1998; MACKNESS e cols., 2001; TOMAS e cols., 2004).

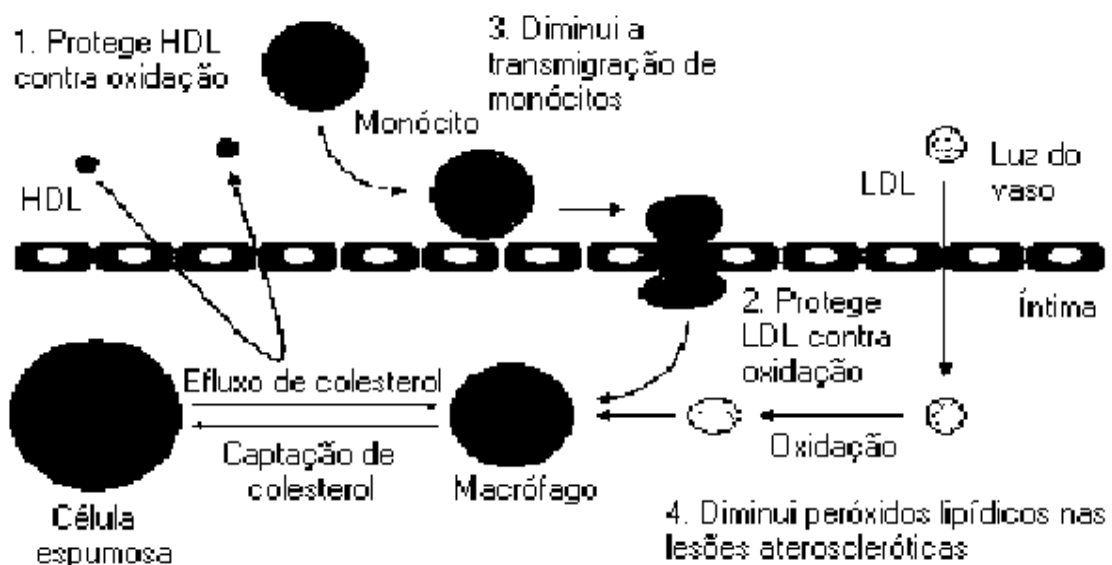
O efeito antioxidante da HDL é devido, principalmente, à presença da enzima paroxonase (PON), a qual está associada à partícula de HDL (MACKNESS e DURRINGTON, 1995; GNASSO e cols., 2002; KLEEMOLA e cols., 2002). No entanto, outros componentes da HDL também apresentam efeito antioxidante, modulando o processo oxidativo por diferentes mecanismos *in vitro* (KUREMOTO e cols., 2003). Estes incluem a apolipoproteína A-I, a enzima PAF (fator de ativação plaquetária acetil-hidrolase), a lecitina-colesterol:acil transferase e a proteína de transferência de ésteres de colesterol (KWITEROVICH, 1998; AVIRAM, 1999a e 1999b; KAPLAN e AVIRAM, 1999; SORENSON e cols., 1999; HONG e cols., 2001; KOCH e cols., 2001; MACKNESS e cols., 2001; SOZMEN e cols., 2001; VAN LENTEN e cols., 2001; KLEEMOLA e cols., 2002; KUREMOTO e cols., 2003). Todos esses componentes, os quais são importantes determinantes do metabolismo da HDL e do transporte reverso do colesterol, são inativados durante o processo de inibição da oxidação da LDL pela HDL, resultando em impedimento do transporte reverso do colesterol e favorecendo a expressão de moléculas de adesão (WATSON e cols., 1995; KWITEROVICH, 1998; FRANCIS, 2000; LIBBY, 2001; MACKNESS e cols., 2002; LI e cols., 2003).

A paroxonase humana é uma enzima polimórfica constituída de uma família multigênica que inclui os genes PON1, PON2 e PON3. Todos os três genes da PON estão próximos entre si no cromossomo 7. A paroxonase está amplamente distribuída em vários tecidos, incluindo cérebro, fígado, rins, pulmões, pâncreas, placenta, testículos, intestino e soro (LEUS e cols., 2001; LI e cols., 2003; DANTOINE e cols., 2003; DRAGANOV e LA DU, 2004). A enzima paroxonase foi caracterizada, inicialmente, como uma organofosfato-hidrolase e o seu nome deriva de um dos substratos mais comumente utilizados, o paroxon. A paroxonase sérica catalisa a hidrólise de inseticidas organofosforados e gases tóxicos, sendo a principal forma de proteção do sistema nervoso

contra esses compostos (LI e cols., 2003). No entanto, a verdadeira função fisiológica da enzima permanece, ainda, desconhecida.

A PON1 é uma esterase dependente de cálcio, sintetizada no fígado e secretada para a circulação sanguínea, onde encontra-se associada exclusivamente às partículas de HDL (DRAGANOV e LA DU, 2004; DANTOINE e cols., 2003). Além do paroxon, a enzima é capaz de hidrolisar outros pesticidas organofosforados sintéticos, como por exemplo, metabólitos oxons de clorpirifos e de diazinon, e gases tóxicos como, sarin e soman. O paroxon é um metabólito tóxico produzido no fígado a partir do paration (TOMAS e cols., 2004). A PON também é capaz de hidrolisar outros substratos, como acetato de fenila (ação aril-esterase), ácidos carboxílicos aromáticos, lactonas, peróxidos lipídicos (hidroperóxido de linoleato de colesterol e hidroperóxido de fosfatidilcolina) e estatinas (WATSON e cols., 1995; MACKNESS e cols., 1996; AVIRAM e cols., 1998; NAVAB e cols., 1997; AVIRAM e cols., 2000; TOMAS e cols., 2004). No entanto, o verdadeiro substrato fisiológico para a PON não é conhecido. Acredita-se, porém, que os fosfolípídeos oxidados presentes na LDL oxidada sejam os prováveis substratos fisiológicos. Assim, alguns estudos experimentais sugerem que a paroxonase pode diminuir o risco para a DAC pela prevenção da oxidação da LDL. Draganov e La Du (2004) descreveram os principais mecanismos até então atribuídos à PON para proteção contra DAC e aterosclerose: (1) proteção da HDL contra oxidação, preservando suas funções e aumentando o efluxo celular de colesterol para os macrófagos; (2) proteção da LDL contra oxidação, diminuindo a formação de peróxidos lipídicos; (3) redução dos efeitos da LDL oxidada, diminuindo o efeito citotóxico e inflamatório de fosfolípídeos oxidados, diminuindo a captação de LDL por macrófagos e diminuindo a transmigração de monócitos induzida pela LDL oxidada e (4) diminuindo peróxidos lipídicos nas lesões ateroscleróticas. Estes mecanismos estão demonstrados na Figura 2.

Figura 2. Mecanismos de proteção da PON contra DAC.



As PON2 e PON3 têm atividades arilesterase/paroxonase limitada ou ausente, mas apresentam atividade semelhante à PON1 na hidrólise de lactonas alifáticas de cadeia longa e medicamentos contendo lactonas ou carbonatos cíclicos. A PON3 humana tem sido encontrada associada à HDL, mas cerca de duas vezes menos abundante do que a PON1. Além disso, a PON3 tem atividades arilesterase e paroxonase muito limitadas, embora compartilhe o substrato lactona com a PON1, sendo talvez a principal responsável pela hidrólise de estatinas e espiranolactonas (LA DU, 2001).

A genética da paroxonase vem sendo elucidada e os estudos forneceram resultados sobre a diferenciação entre os fenótipos PON1 e PON2. O gene PON1 possui dois polimorfismos descritos na região codificadora e cinco na região promotora. O gene PON2 também possui dois polimorfismos. Polimorfismos são variações comuns na sequência de nucleotídeos. De forma simplificada, os alelos específicos em um ou mais *loci* representam o genótipo para aqueles genes, sendo o fenótipo o efeito da ação do gene. Os dois polimorfismos da PON1 mais estudados são na posição 55, onde ocorre uma substituição do aminoácido metionina (M) por leucina (L), e outro na posição 192 com uma substituição de arginina (R) por glutamina (Q). Ambos os polimorfismos afetam a atividade catalítica das isoenzimas da PON1, sendo que a alteração na cinética de hidrólise é dependente do tipo de substrato. Assim, a PON1 homozigótica para o alelo 55 LL apresenta alta atividade hidrolítica usando o paroxon como substrato, seguida do heterozigoto 55 LM e a PON1 homozigótica 55 MM possui a menor atividade. No entanto, em relação à hidrólise de peróxidos lipídicos na LDL, esta sequência de especificidade é

exatamente inversa, com o alelo M sendo o mais ativo (MACKNESS e cols., 1998; LI e cols., 2003).

O polimorfismo PON1-192 Q/R também causa alteração na atividade hidrolítica da isoenzima dependente de substrato. O paroxon é hidrolisado mais eficientemente pela PON1-192 R (ADKINS e cols., 1993; HUMBERT e cols., 1993; LI e cols., 2000; JARVIK e cols., 2000). A atividade catalítica da paroxonase com acetato de fenila como substrato não foi influenciada pela variação genética no aminoácido 192 da enzima (NAVAB e cols., 1997; LA DU, 1996; LI e cols., 2003). Já em relação à hidrólise dos peróxidos lipídicos o polimorfismo PON1-192 R parece ser menos efetivo (AVIRAM e cols., 1998; MACKNESS e cols., 1998, VAN LENTEN e cols., 2001; KUREMOTO e cols., 2003).

Recentemente, muitos pesquisadores vêm investigando a associação entre os polimorfismos genéticos da PON e a DAC e os resultados são conflitantes. Alguns estudos sugerem que existe associação, principalmente em relação ao alelo PON1-192 R, o qual tem sido considerado um fator de risco independente e positivamente relacionado à DAC e ao alelo L PON1-55 (PFOHL e cols., 1999; ANTIKAINEN e cols., 1996), mas outros estudos demonstraram não existir associação desses polimorfismos com a DAC (LI e cols., 2003; HEGELE, 1999).

O gene PON2 possui dois polimorfismos mais comuns, com substituições nos aminoácidos das posições 148 (glicina/alanina) e 311 (cisteína/serina). Os polimorfismos são, então, designados como 148 G/A e 311 C/S (LI e cols., 2003). O polimorfismo da PON2 mais estudado é o 311 C/S. Sanghera e cols. (1998) relataram que esse polimorfismo esteve associado com a DAC, porém não ficou estabelecido se ele está envolvido diretamente com a aterosclerose ou se modifica o efeito do polimorfismo PON1-192. Leus e cols. (2001), analisando indivíduos com hipercolesterolemia familiar não encontraram relação com os polimorfismos PON1-55 e PON1-192, mas demonstraram uma associação entre o polimorfismo PON2-311 e manifestações clínicas da DAC.

Assim como há discordância de informações em relação à associação do polimorfismo da PON com a DAC, também existem inconsistências nos resultados da atividade da enzima em pacientes com doenças cardíacas. Enquanto alguns estudos indicaram que a atividade da PON1 está associada positivamente à proteção contra a DAC (AYUB e cols., 1999; McELVEEN e cols., 1986), outros estudos não demonstraram essa associação (SECCHIERO e cols., 1989). Em geral, pacientes que apresentam alto risco para a DAC, como hipercolesterolêmicos e diabéticos com aterosclerose estabelecida, possuem baixa atividade da PON1 (MACKNESS e cols., 2002; JAMES e cols., 2000; ABBOTT e cols., 1995).

A atividade da PON pode ser, ainda, modulada por agentes externos (JARVIK e cols., 2002). Navab e cols. (1997) demonstraram que a injeção de LDL oxidada, ou fosfatidilcolina oxidada, no plasma de camundongos reduz a atividade da PON, aparentemente por reduzir a síntese hepática da enzima. A atividade sérica da PON encontra-se diminuída em fumantes com DAC, onde está relacionada com a redução da concentração sérica da enzima (JAMES e cols., 2000; KLEEMOLA e cols., 2002; JARVIK e cols., 2002; DANTOINE e cols., 2003; LI e cols., 2003). A atividade sérica da

PON também está diminuída após a ingestão de refeição rica em gordura oxidada (SUTHERLAND e cols., 1999), na gravidez e menopausa (LI e cols., 2003) e após infarto do miocárdio (McELVEEN e cols., 1986; AYUB e cols., 1999; VOETSCH e cols., 2002). Por outro lado, pode estar aumentada pelo consumo de antioxidantes (polifenóis, vitaminas C e E) da dieta (JARVIK e cols., 2002; DANTOINE e cols., 2003) e medicamentos (estatinas e contraceptivos orais) (JARVIK e cols., 2002; KLEEMOLA e cols., 2002; LI e cols., 2003). Indiretamente, esses resultados sugerem que o mecanismo de ação de alguns compostos antiateroscleróticos pode ser via ativação da paroxonase.

A relação entre o polimorfismo da PON e os lipídeos e lipoproteínas plasmáticas também vem sendo avaliada. Hegele (1999) observou que os polimorfismos da PON1 estão associados com variações nas principais lipoproteínas plasmáticas. Nesse estudo, os indivíduos homozigóticos portadores do genótipo PON1-192 QQ tiveram, em geral, melhor perfil lipídico em comparação com os homozigóticos 192 RR. Mais recentemente, Leus e cols. (2001) relataram que o polimorfismo PON1-55 MM está associado a baixos níveis de lipídeos (colesterol total e LDL-C). Por outro lado, indivíduos portadores desse mesmo polimorfismo tiveram, em média, maiores concentrações de colesterol total e LDL-C (FANELLA e cols., 2000). No entanto, outros estudos não conseguiram demonstrar associação entre os polimorfismos da PON e os lipídeos plasmáticos (LI e cols., 2003).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A doença arterial coronariana, a mais importante manifestação clínica da aterosclerose, ainda é a principal causa de morte nas sociedades desenvolvidas. Nas últimas décadas, os principais fatores de risco para a DAC foram definidos e muitas intervenções terapêuticas foram introduzidas. O mais proeminente fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose é a hipercolesterolemia, particularmente LDL-colesterol elevado associado com HDL-colesterol diminuído. Dos inúmeros fatores de risco, e suas modulações gênicas, envolvidos no processo aterosclerótico, especial ênfase tem sido dada ao estudo do polimorfismo e atividade da enzima paroxonase (PON) associada à partícula de HDL. O potencial protetor da HDL para a DAC não está totalmente esclarecido. A relação inversa entre a concentração de HDL e o risco para a DAC levaram à identificação do “transporte reverso do colesterol”, onde o colesterol dos tecidos periféricos (inclusive artérias) é captado pelas partículas de HDL e transportado para o fígado para ser catabolizado. No entanto, a HDL também protege as partículas de LDL contra modificações oxidativas, através da destruição de peróxidos lipídicos. A LDL modificada oxidativamente está envolvida em vários passos da aterogênese. Este efeito protetor da HDL deve-se, principalmente, ou está associado à PON. A atividade sérica da PON humana apresenta uma grande variação inter-individual. A base molecular para essa variação é o polimorfismo na região codificadora do gene, resultando na substituição de aminoácidos com a conseqüente produção de isoenzimas. Vários estudos buscam mostrar uma associação entre os polimorfismos da PON e a DAC, a influência dos polimorfismos na atividade enzimática e nos lipídeos plasmáticos, na tentativa de

encontrar um marcador adicional de risco precoce para a DAC. No entanto, ainda existem controvérsias para essas associações.

Dessa forma, considerando a ausência de informações sobre esse tema para a população brasileira, o objetivo principal desse estudo foi avaliar a distribuição dos polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311 e os seus efeitos na atividade enzimática e nas concentrações dos lipídeos e das lipoproteínas no soro de indivíduos saudáveis e pacientes hipercolesterolêmicos sem DAC.

2.1. Objetivos Específicos

- a) Verificar a distribuição dos genótipos e a frequência relativa de alelos dos polimorfismos dos genes PON1-55, PON1-192 e PON2-311 da enzima paroxonase em pacientes hipercolesterolêmicos;
- b) Verificar o efeito dos polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311 na atividade da enzima paroxonase no soro dos pacientes hipercolesterolêmicos;
- c) Avaliar a influência dos polimorfismos da PON na concentração dos lipídeos e lipoproteínas séricas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

3.1.1. Grupo de estudo

O grupo de estudo foi constituído de 67 pacientes caucasianos, não aparentados, de ambos os sexos, com idade de $57,2 \pm 13,3$ anos, com diagnóstico laboratorial de hipercolesterolemia (colesterol total ≥ 240 mg/dL), condição determinada de acordo com os critérios das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias (SANTOS, 2001). Os pacientes foram provenientes de Postos de Saúde da Grande Florianópolis (Córrego Grande e Picadas do Sul), de Tubarão (Dehon, Unisul) e Turvo.

3.1.2. Grupo controle

O grupo controle foi constituído por 82 indivíduos caucasianos, de ambos os sexos, com idade de $58,05 \pm 9,5$ anos, sem histórico familiar de doença arterial coronariana precoce e com valores ideais ou limítrofes de colesterol total e LDL-C (Colesterol total < 240 mg/dL e LDL-C < 130 mg/dL), segundo as III Diretrizes

Brasileiras sobre Dislipidemias (SANTOS e cols., 2001). Os participantes foram voluntários selecionados pelo corpo clínico dos Postos de Saúde supracitados.

Nesse estudo, não foram incluídos gestantes, pacientes apresentando diabetes, hiper ou hipotireoidismo, doenças hepáticas, doenças renais, neoplasias, sob medicação hipolipemiante ou em uso de contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal ou anabolisantes, devido à grande influência na concentração sérica dos lipídeos.

O protocolo experimental utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC em 25/11/2002, protocolo 186/2002 (Anexo A). Todos os indivíduos que concordaram em participar desse estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B) e cada participante respondeu a um questionário sobre qualidade de vida e história médica pessoal e familiar (Anexo C).

3.2. Material

3.2.1. Amostras biológicas

Foram coletadas amostras de sangue (15 mL) dos participantes, após jejum de 12 h, por meio de sistema de coleta a vácuo, em tubos com ou sem anticoagulante (EDTA 1 mg/mL ou EDTA e NaF). As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 min para obtenção do soro ou plasma para serem utilizados nas determinações bioquímicas (perfil lipídico e atividade enzimática da paroxonase). As amostras de sangue total, coletadas com EDTA, foram utilizadas para a extração do ácido nucléico (DNA) das células sanguíneas, a serem utilizados nas análises moleculares.

3.2.2. Materiais e reagentes

Os reagentes utilizados e a proveniência foram os seguintes: Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e Metanol foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, RJ). Paroxon (o,o-dietil-o-p-nitrofenilfosfato) da Sigma. O Triton X-100, cloreto de sódio, cloreto de potássio, etanol absoluto, isopropanol, clorofórmio, fenol, ácido acético glacial, azul de bromofenol da MERCK S.A. (Rio de Janeiro, R.J.);

cloreto de magnésio da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), hidróxido de sódio, SDS, ácido bórico, Tris (hidroximetil) aminometano ultrapuro, agarose ultrapura, enzimas de restrição *Mbol* e *Nla III* (Sinapse-Fermentas), *DdeI* (BioLabs Inc, New England), marcadores moleculares de tamanho molecular de DNA de 100 bp e 1Kb, da Gibco BRL, Life technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, E.U.A.); *Taq* DNA polimerase, solução de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), e brometo de etídeo da Amershan Pharmacia Biotech, Inc. (Uppsala, Suécia). Os diferentes iniciadores (oligonucleotídeos específicos) foram adquiridos da Gibco BRL, Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, EUA), Papel térmico de alto contraste – Apha Innotech Corporation. Os reagentes para a determinações de colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos e glicose foram gentilmente doados pelo laboratório Roche S.A (São Paulo, SP).

3.3. Métodos

3.3.1. Determinações bioquímicas

As concentrações séricas de colesterol total (CT) e do colesterol da HDL (HDL-C) foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico CHOD/PAP (Roche). O HDL-C foi determinado pelo método homogêneo da Roche (São Paulo, SP). A concentração sérica de triglicerídeos (TG) foi determinada pelo método enzimático colorimétrico GPO/PAP Roche (São Paulo, SP). A concentração de colesterol da LDL foi obtida através da fórmula de Friedewald ($LDL-C = CT - HDL-C - TG/5$), quando a concentração sérica de triglicerídeos foi inferior a 400 mg/dL (FRIEDEWALD e cols., 1972). A concentração de colesterol da VLDL (VLDL-C) foi obtida pela divisão da concentração sérica de triglicerídeos por cinco. A glicose de jejum foi determinada pelo método GOD/PAP (Roche). Todas as determinações foram realizadas no analisador automático Cobas Mira Plus Roche (Basel, Suíça).

3.3.2. Extração do DNA genômico das células sangüíneas periféricas

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total pelo método de precipitação salina modificado por Salazar e cols. (1998). As amostras de sangue (1000 μ L) foram submetidas à lise celular com 900 μ L de tampão Tris-1 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, $MgCl_2$ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220 μ L do tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, $MgCl_2$ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0, NaCl a 400 mM) contendo SDS a 1%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 μ L de NaCl 5 M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação etanólica e finalmente, ressuspendido em 100 μ L do tampão TE (Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1 mM, pH 8,0) e mantido a -20 °C.

3.3.2.1. Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico

A integridade das amostras de DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM, pH 8,0) em cuba eletroforética (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) (SAMBROOK e cols., 1989). O gel foi imerso em tampão TBE e as amostras contendo 5 μ L do DNA e 2 μ L do tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 30%) foram aplicadas. Aplicaram-se também 5 μ L do marcador de tamanho molecular de DNA de 1 kb diluído no tampão de amostra 1:6 (v/v). A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 45 minutos, utilizando uma fonte modelo EPS 200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia). Após a eletroforese, as bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador modelo Macrovue (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia), sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/L). Os resultados foram documentados com o sistema fotográfico Polaroid modelo DS 34 (Cambridge, EUA).

A quantificação e análise do grau de pureza (relação A_{260}/A_{280} = Absorbância em 260 e 280 nm, respectivamente) dos extratos de DNA foram realizadas em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Fullerton, CA, EUA), após diluição das amostras (1:50 v/v) em tampão TE, pH 8,0

3.3.3. Análise dos polimorfismos dos genes 55, 192 e 311 da PON

A genotipagem dos polimorfismos PON1-55 (L/M), PON1-192 (Q/R) e PON2-311 (C/S) foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase seguida pela análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Os *primers* utilizados na reação de PCR foram selecionados com base em dados previamente publicados e nas informações do Banco de dados do *National Institute of Health* (NIH, 2002) e produzidos pela Life Technologies do Brasil (SP, Brasil). A homologia das seqüências dos iniciadores para cada região polimórfica foi estudada empregando-se o programa BLAST. As seqüências dos iniciadores específicos de cada polimorfismo e os tamanhos de fragmentos amplificados estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Seqüências dos iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados para os polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311

Gene		Seqüência de iniciadores	Fragmento
PON1-55	Sense	5'-CACAATTGTCTTTTAAACGATGA-3'	269 pb
	Antisense	5'-AGGTGTGATAAAGAAATGGATCC-3'	
PON1-192	Sense	5'-CCATTATAGCTAGCACGAAGGC-3'	331 pb
	Antisense	5'-GCCATCGGGTGAAATGTTGA-3'	
PON2-311	Sense	5'-GTAAAGTTATCGCACTTTGATGC-3'	294 pb
	Antisense	5'-CCTTAATCAGTGTGTCATTGTGG-3'	

A amplificação dos genes 55, 192 e 311 foi realizada utilizando o seguinte protocolo: 1 µL (~100 ng) da solução de DNA genômico, 5 µL de tampão da reação de PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM e (NH₄)₂SO₄ 20 mM), 50 µM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 pM de cada iniciador, 1 U da enzima *Taq* polimerase e água deionizada esterilizada para volume final de 50 µL. Os tubos foram homogeneizados e colocados no termociclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA, EUA), com condições de temperatura diferentes para cada sistema, como descrito a seguir. Para o polimorfismo PON1-55 seguiu-se o seguinte protocolo: desnaturação inicial (*hot start*): 98 °C por 3 min, seguido de 35

ciclos de amplificação: 95 °C por 1 min (desnaturação), 46 °C por 2 min (hibridação) e 72 °C por 1 min (extensão); extensão final: 72 °C por 10 min. Ao final dos ciclos a reação foi interrompida por resfriamento a 4 °C. Para o polimorfismo PON1-192 utilizou-se uma desnaturação inicial (*hot start*): 98 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificação: 94 °C por 1 min (desnaturação), 55 °C por 2 min (hibridação) e 72 °C por 1 min (extensão); extensão final: 72 °C por 10 min. Ao final, a reação foi interrompida por resfriamento a 4 °C. O protocolo para o polimorfismo PON2-311 está descrito a seguir: desnaturação inicial (*hot start*): 98 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de amplificação: 94 °C por 1 min (desnaturação), 52 °C por 1 min (hibridação) e 72 °C por 1 min (extensão); extensão final: 72 °C por 10 min. Ao final, a reação foi interrompida por resfriamento a 4 °C.

Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose 2,0 % em tampão TBE (Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM, pH 8,0), utilizando uma cuba eletroforética horizontal da Gibco BRL (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA). Foram aplicados 7 µL do produto de PCR diluído em 1 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25 %, xilenocianol FF 0,25 % e glicerol 30 %) e 5 µL do marcador do tamanho molecular de DNA de 100 pares de bases (bp) diluído também no tampão de amostra em 1:6 (v/v). A separação eletroforética foi realizada a 100 V por 45 min, utilizando uma fonte de energia da Pharmacia LKB modelo EPS200 (Uppsala, Suécia). A seguir o gel foi corado por imersão em solução de brometo de etídeo (0,5 mg/L) por 10 min e as bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz UV em um transiluminador Pharmacia LKB Macrouve (Uppsala, Suécia). O gel foi fotografado empregando o sistema de captura de imagens Multimagen Light Cabinet, Alpha Innotech Co., EUA, e o tamanho das bandas dos produtos de PCR foi analisado em relação ao do marcador de DNA empregando-se o programa de análise de imagens Chemilmager 4400 v 5.5 (Alpha Innotech Co, EUA). Os produtos de PCR foram armazenados a -20 °C até a análise por RFLP.

3.3.3.1. Reação de restrição dos produtos de PCR

Para a análise dos polimorfismos genéticos da paroxonase, os produtos de PCR específicos foram digeridos com as enzimas de restrição *Nia III*, *MboI*, e *DdeI*. A enzima *Nia III* foi utilizada na pesquisa do polimorfismo PON1-55 e utilizou-se o

seguinte protocolo: 1 µL de tampão de reação, 2 U da enzima, 8,7 µL de produto de PCR e 0,1 µL de BSA para um volume final de 10 µL. Na pesquisa do polimorfismo PON1-192, foi utilizada a enzima de restrição *MboI*: utilizou-se 8,9 µL de produto de PCR, 1 U da enzima para volume final 10 µL. A enzima *DdeI* foi utilizada na pesquisa do polimorfismo PON2-311: 1 µL de tampão, 2,5 U da enzima e 8,25 µL do produto de PCR, para volume final de 10 µL.

Todos os sistemas foram incubados a 37 °C por 2 h, para posterior análise dos fragmentos de restrição.

3.3.3.2. Análise dos fragmentos de restrição

Os produtos de digestão enzimática dos polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311 foram identificados em gel de agarose 1%. Foram aplicados 10 µL do produto de restrição contendo 3 µL do tampão de amostra. Foi aplicado também 3 µL de marcador de tamanho molecular de DNA de 50 ou 100 pb diluído em tampão de amostra 1:6 (v/v). A separação eletroforética foi realizada a 100 V durante 45 min. O gel de agarose foi corado por imersão em solução com brometo de etídeo a 0,5 mg/L e documentado, conforme previamente descrito. Após a separação eletroforética, observou-se a presença dos fragmentos de diferentes tamanhos, de acordo com cada polimorfismo.

Para o polimorfismo PON1-55, o genótipo LL foi caracterizado pela presença dos fragmentos 51, 92 e 126 pb; homozigotos MM, 51 e 218 pb e heterozigotos LM, 51, 92, 126 e 218 pb.

Para o polimorfismo PON1-192, o genótipo RR foi caracterizado pela presença dos fragmentos 28, 122 e 181 pb; homozigotos QQ, 150 e 181 pb e heterozigotos QR: 28, 122, 150 e 181 pb.

No polimorfismo PON2-311, a presença dos fragmentos 67, 98 e 129 pb indicam o genótipo CC; a presença de fragmentos de 98 e 196 pb indicam o genótipo SS e de 67, 98, 129 e 196, caracterizam o genótipo CS.

3.3.4. Controle de Qualidade das análises bioquímicas e moleculares

As dosagens de colesterol total, triglicerídeos, HDL-colesterol e glicose foram determinadas paralelamente com soros controle normal (Precinorm Roche) e patológico (Precipath Roche).

As amplificações realizadas pela técnica de PCR, foram monitoradas utilizando-se o controle de reagentes (tubo no qual são adicionados todos os reagentes para a amplificação exceto a amostra de DNA) em cada conjunto de reações. Esse controle visa detectar possíveis contaminações dos reagentes de PCR por ácidos nucleicos ou produtos de PCR. Também foram repetidas de forma aleatória, 10 % de todas as reações de amplificação.

As reações de restrição enzimática foram monitoradas utilizando-se um controle positivo, que constitui da análise de uma amostra de genótipo homozigoto para a presença do sítio de restrição em estudo; com isso, evitam-se interpretações errôneas dos genótipos por digestão parcial dos produtos de PCR com a enzima de restrição (ICCMB, 1999). Além disso, outra forma de controlar a qualidade da identificação dos genótipos foi a interpretação por dois analistas separadamente.

3.3.5. Atividade Enzimática

3.3.5.1. Atividade arilesterase da paroxonase no soro total e na HDL

A atividade arilesterase da enzima paroxonase foi determinada de acordo com o método descrito por Gan e cols. (1991). A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de soro diluído 20 vezes, ou de 20 µL de HDL diluída 20 vezes, em 2 mL de tampão Tris HCl 20 mmol/L, pH 8,0, contendo CaCl₂ 1 mmol/L e acetato de fenila 1 mmol/L, usado como substrato. A cinética da reação de formação do fenol foi monitorada com leituras de absorbância a cada minuto durante 3 min, em comprimento de onda 270 nm, a 25 °C. Para corrigir a hidrólise espontânea do acetato de fenila foi incluído um branco de reação. Para o cálculo da atividade, foi considerado o coeficiente de absorvidade molar de $1,31 \times 10^3 \text{ L}^{-1}\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. O resultado foi expresso em U/mL, sendo que uma unidade arilesterase corresponde a 1 µmol de acetato de fenila hidrolisado por minuto, por mL de soro (GAN e cols., 1991).

A HDL utilizada nas reações foi isolada por precipitação seletiva das lipoproteínas contendo apolipoproteína B, utilizando-se a mistura de ácido fosfotúngstico e íons magnésio (1,5 mM e 54 mM, respectivamente). A mistura de soro e solução precipitante (1:1, v/v) foi agitada por 30 s, em agitador tipo vórtex, e centrifugada a 3500 rpm durante 15 min. A HDL presente no sobrenadante límpido foi dialisada em tampão PBS pH 7,4 por 12 h, a 4 °C (membrana com porosidade de 12000-14000 Da, Spectrum - Gardena - EUA).

3.3.5.2. Atividade paroxonase da enzima paroxonase

A atividade paroxonase foi avaliada conforme metodologia descrita anteriormente (GAN e cols., 1991). A reação foi iniciada pela adição de 12,5 µL de soro a 250 µL tampão Tris HCl 20 mmol/L, pH 8,0, contendo CaCl₂ 1 mmol/L e paroxon 5,5 mmol/L. A velocidade de formação do p-nitrofenol foi monitorada através das leituras da absorbância em 405 nm, a 37 °C, durante 3 min (Cobas Mira Plus, Roche). Para o cálculo da atividade utilizou-se o coeficiente de absorvidade molar de $18,05 \times 10^3 \text{ L}^{-1}\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A atividade da paroxonase, expressa em U/L, é definida como a formação de 1 µmol de p-nitrofenol por min, por litro de soro.

3.4. Análise estatística

Todos os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão ou média \pm erro-padrão. Os resultados dos parâmetros laboratoriais e clínicos dos participantes de ambos os grupos foram comparados utilizando-se o teste *t* de Student não pareado ou o teste de Mann-Whitney quando os dados não apresentaram distribuição normal. A análise de correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a relação entre as atividades da PON com diferentes substratos e entre a atividade da PON e a concentração de HDL-C. As diferenças na distribuição dos genótipos e dos alelos entre os dois grupos foram testadas através do teste qui-quadrado (χ^2). A análise de variância (ANOVA) e o teste complementar de Tukey ou teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foram utilizados para avaliar o efeito dos polimorfismos da PON na atividade enzimática e na concentração dos lipídeos séricos. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Características biodemográficas e perfil lipídico dos indivíduos do grupo controle e pacientes do grupo de estudo.

Participaram desse estudo 82 indivíduos com valores de colesterol total < 240 mg/dL e de LDL-C < 130 mg/dL (grupo controle) e 67 pacientes hipercolesterolêmicos (grupo de estudo). As características biodemográficas da população estudada estão apresentadas na Tabela 1. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos estudados em relação ao número de participantes do sexo masculino e feminino, idade, índice de massa corporal (IMC), hipertensão (PAS > 130/85 mmHg, segundo IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial) (MION e cols., 2004) e tabagismo. No entanto, em ambos os grupos o número de mulheres participantes foi aproximadamente duas vezes maior que o número de homens (Tabela 1).

Tabela 1. Dados biodemográficos dos indivíduos do grupo controle e pacientes hipercolesterolêmicos

Controle	Hipercolesterolêmico	p
----------	----------------------	---

Participantes, n (M/F)	82 (29/53)	67 (23/44)	NS
Idade (anos)	57,18 ± 13,33	58,04 ± 9,50	NS
IMC (kg/m ²)	26,45 ± 3,93	26,69 ± 3,89	NS
Hipertensão	39 (47,56 %)	31 (46,27 %)	NS
Tabagismo	9 (6 %)	7 (5 %)	NS

Dados expressos como média ± desvio-padrão. M/F, masculino/feminino; IMC, Índice de Massa Corporal; NS, não significativo (teste χ^2 e teste *t* de Student)

Os resultados do perfil lipídico dos participantes estão apresentados na Tabela 2. A concentração de colesterol total e LDL-C foram significativamente maiores no grupo de estudo em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). As concentrações de HDL-C, VLDL-C e triglicerídeos foram semelhantes para os dois grupos analisados. No entanto, a concentração de triglicerídeos foi superior a 200 mg/dL em 31,3 % dos participantes do grupo hipercolesterolêmico caracterizando, portanto, a presença de hiperlipidemia mista nesses pacientes. Entre os participantes do grupo controle 23,2 % apresentaram concentrações de triglicerídeos maiores que 200 mg/dL.

Tabela 2. Perfil lipídico dos indivíduos do grupo controle e pacientes hipercolesterolêmicos

Parâmetros	Controle	Hipercolesterolêmico	P
Bioquímicos (mg/dL)	(n = 82)	(n = 67)	
Colesterol total	202,91 ± 25,84	274,45 ± 55,58	<0,001
HDL-C	51,73 ± 12,56	54,60 ± 13,77	NS
LDL-C	119,85 ± 23,80	176,63 ± 37,21	<0,001
VLDL-C	31,33 ± 18,82	43,22 ± 45,98	NS
Triglicerídeos ^a	156,66 ± 94,08	216,12 ± 229,89	NS

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. LDL-C = Colesterol da LDL, HDL-C = colesterol da HDL, VLDL-C = colesterol da VLDL. Os valores de LDL-C no grupo de estudo são representativos de 60 amostras com concentrações de triglicerídeos menores que 400 mg/dL. NS = não significativo (Teste *t* de Student e teste de Mann-Whitney). ^a Dois pacientes do grupo hipercolesterolêmico apresentaram valores de triglicerídeos de 1629 e 854 mg/dL, os quais foram responsáveis pela grande dispersão dos resultados.

4.2.1. Identificação do polimorfismo 55 do gene da *PON1* e distribuição dos genótipos

A identificação dos genótipos do polimorfismo PON1-55 foi realizada pela análise dos fragmentos de restrição após digestão com a enzima *Nla III*, (Figura 3). O genótipo LL foi caracterizado pela presença dos fragmentos 51, 92 e 126 pb; o genótipo MM pelos fragmentos 51 e 218 pb e o genótipo heterozigoto LM pelos fragmentos 51, 92, 126 e 218 pb.

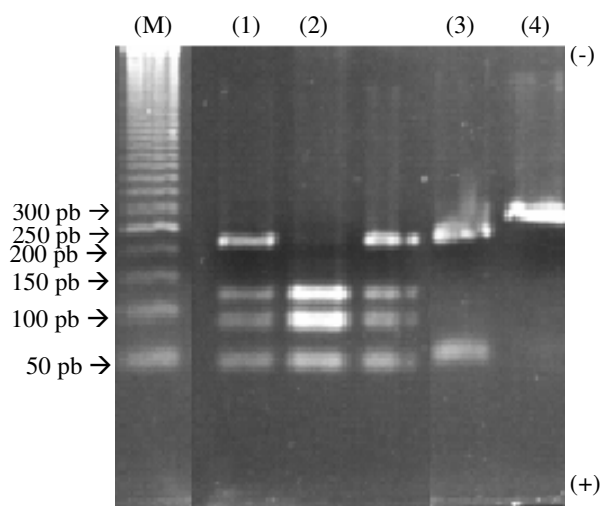


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de restrição enzimática com *Nla III*, em tampão TBE pH 8,0, corado com brometo de etídeo para a pesquisa do polimorfismo PON1-55. Coluna (M) padrão de tamanho molecular de DNA de 50 bp; (1) genótipo LM; (2) genótipo LL; (3) genótipo MM; (4) produto de PCR.

A distribuição dos genótipos e a frequência relativa dos alelos do polimorfismo PON1-55 nos indivíduos do grupo controle e nos pacientes do grupo de estudo estão mostradas na Tabela 3. As frequências dos genótipos MM, LM e LL da PON1-55 nos indivíduos do grupo controle foram de aproximadamente 16, 48 e 37 %, respectivamente; e nos pacientes do grupo de estudo foram de aproximadamente

18, 46 e 36 %, respectivamente. Essas frequências, bem como a frequência alélica (controle: L, 0,61; M, 0,39 vs hipercolesterolêmico: L, 0,59; M, 0,41), para o polimorfismo PON1-55 não foram estatisticamente diferentes entre os indivíduos do grupo controle e pacientes hipercolesterolêmicos ($p > 0,05$, teste χ^2) (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos genótipos e frequência relativa de alelos para o polimorfismo 55 do gene da PON1

	Controle	Hipercolesterolêmico
	n (%)	n (%)
Genótipo PON1-55		
MM	13 (15,8)	12 (17,9)
LM	39 (47,6)	31 (46,3)
LL	30 (36,6)	24 (35,8)
Alelos		
M	0,39	0,41
L	0,61	0,59

Não houve diferença significativa entre os grupos (teste χ^2).

4.2.2. Identificação do polimorfismo 192 do gene da PON1 e distribuição dos genótipos

Para a pesquisa do polimorfismo PON1-192 foi utilizada a digestão com a enzima *Mbo I*, e os produtos de restrição enzimática estão mostrados na Figura 4. Na presença do sítio de restrição para *Mbo I*, o genótipo RR foi caracterizado pela presença dos fragmentos 28, 122 e 181 pb; o genótipo QQ pelos fragmentos 150 e 181 pb e o genótipo heterozigoto QR pelos fragmentos 28, 122, 150 e 181 pb.

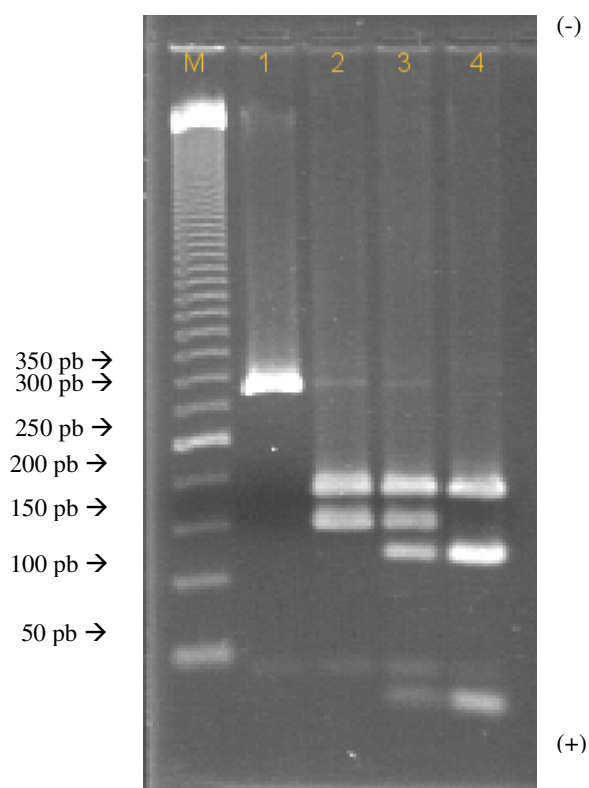


Figura 4. Produtos de restrição enzimática com *Mbo I*, em tampão TBE pH 8,0 corado com brometo de etídeo, para a pesquisa do polimorfismo PON1-192. Coluna (M) marcador de tamanho molecular de DNA de 50 bp; (1) produto de PCR; (2) genótipo RR; (3) genótipo QR; (4) genótipo QQ.

Os genótipos e a frequência relativa dos alelos do polimorfismo PON1-192 nos indivíduos do grupo controle e nos pacientes do grupo de estudo estão mostrados na Tabela 4. O genótipo QQ foi o mais comum nos indivíduos do grupo controle e pacientes hipercolesterolêmicos (50 e 52 %, respectivamente), seguido pelo QR (39 e 45, respectivamente) e pelo de menor frequência RR (11 e 3 %, respectivamente). A distribuição dos genótipos e a frequência dos alelos Q e R não foram estatisticamente diferentes entre os participantes dos dois grupos ($p > 0,05$, teste χ^2).

Tabela 4. Distribuição dos genótipos e frequência relativa de alelos para o polimorfismo 192 do gene PON1

	Controle	Hipercolesterolêmico
Genótipo PON1-192	n (%)	n (%)
QQ	41 (50,0)	35 (52,2)
QR	32 (39,0)	30 (44,8)

RR	9 (11,0)	2 (3,0)
Alelos		
Q	0,69	0,74
R	0,31	0,26

Não houve diferença significativa entre os dois grupos (teste χ^2).

4.2.3. Identificação do polimorfismo 311 do gene da PON2 e distribuição dos genótipos

A identificação dos genótipos do polimorfismo PON2-311 foi feita pela análise dos produtos de restrição com enzima *DdeI*. O genótipo CC foi caracterizado pela presença dos fragmentos 67, 98 e 129 pb; a presença dos fragmentos de 98 e 196 pb indica o genótipo SS e os fragmentos de 67, 98, 129 e 196 caracterizam o genótipo CS (Figura 5).

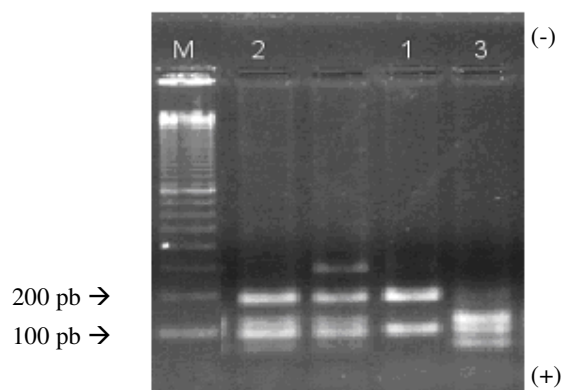


Figura 5. Fragmentos de restrição enzimática com *DdeI*, em tampão TBE pH 8,0, corado com brometo de etídeo, para a pesquisa do polimorfismo PON2-311. Linha M: marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp, na linha 1 o genótipo SS, linha 2 CS e linha 3 o genótipo CC.

A distribuição de genótipos e a frequência relativa de alelos para o polimorfismo PON2-311, nos indivíduos do grupo controle e nos pacientes do grupo de estudo são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição dos genótipos e frequência relativa de alelos para o polimorfismo 311 do gene PON2

Controle	Hipercolesterolêmico
----------	----------------------

Genótipo PON2-311	N (%)	N (%)
CC	5 (6,1)	7 (10,4)
CS	20 (24,4)	18 (26,9)
SS	57 (69,5)	42 (62,7)
Alelos		
C	0,18	0,24
S	0,82	0,76

Não houve variação significativa para os genótipos entre os dois grupos (teste χ^2)

A distribuição dos genótipos e a frequência relativa dos alelos do polimorfismo PON2-311 nos indivíduos do grupo controle e nos pacientes do grupo de estudo estão na Tabela 5. A frequência dos genótipos CC, CS e SS da PON2-311 nos indivíduos do grupo controle foi de aproximadamente 6, 24 e 70 %, respectivamente, e nos pacientes do grupo de estudo foi de aproximadamente 10, 27 e 63 %, respectivamente. A frequência relativa dos alelos C e S foi de aproximadamente 20 e 80 %, respectivamente, para ambos os grupos ($p > 0,05$, teste χ^2).

4.3 Avaliação da atividade enzimática da paroxonase: Atividades arilesterase e paroxonase

As atividades arilesterase e paroxonase da enzima PON sérica foram determinadas utilizando-se os substratos acetato de fenila e paroxon, respectivamente. A atividade arilesterase também foi avaliada na HDL isolada. Os resultados dos ensaios demonstraram que as atividades arilesterase e paroxonase no soro não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos estudados (Figura 6).

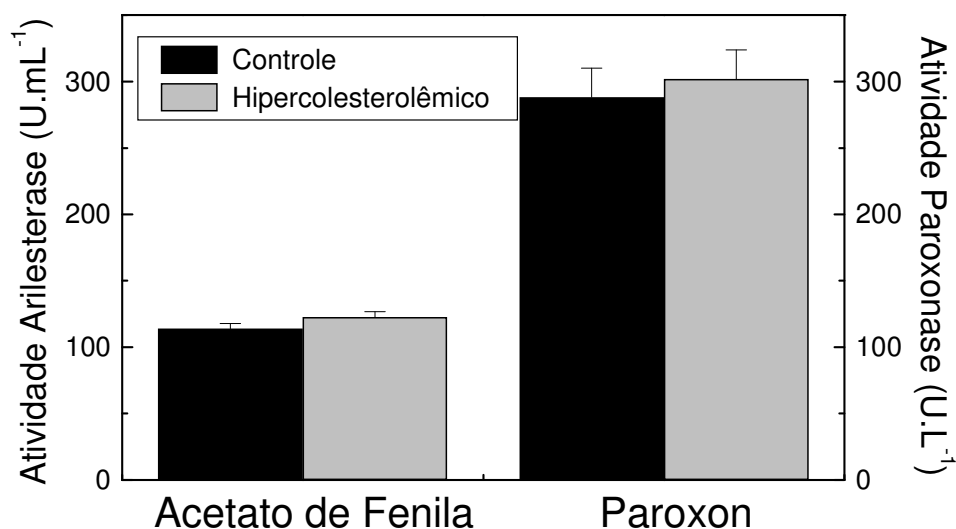


Figura 6. Atividade paroxonase e arilesterase da paroxonase no soro de indivíduos do grupo controle e de pacientes hipercolesterolêmicos. Os resultados estão expressos como média \pm erro-padrão da média. Grupo controle, $n = 82$; grupo hipercolesterolêmico, $n = 67$; U = unidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de acetato de fenila por minuto, por mililitro de soro (arilesterase) ou 1 μmol de paroxon por minuto, por litro de soro (paroxonase). Não houve diferença significativa entre os grupos (Teste de Mann-Whitney).

Para verificar as associações entre as atividades enzimáticas com os dois substratos e com a concentração de HDL-C, os resultados de ambos os grupos foram combinados. A atividade arilesterase da PON no soro apresentou correlação positiva com a atividade paroxonase sérica ($r = 0,34$; $p < 0,001$; Figura 7) e com a atividade arilesterase na HDL ($r = 0,41$; $p < 0,001$; Figura 8). No entanto, não houve correlação da atividade arilesterase da PON na HDL com a concentração sérica de HDL-C ($r = 0,17$; $p > 0,05$), conforme demonstrado na Figura 9.

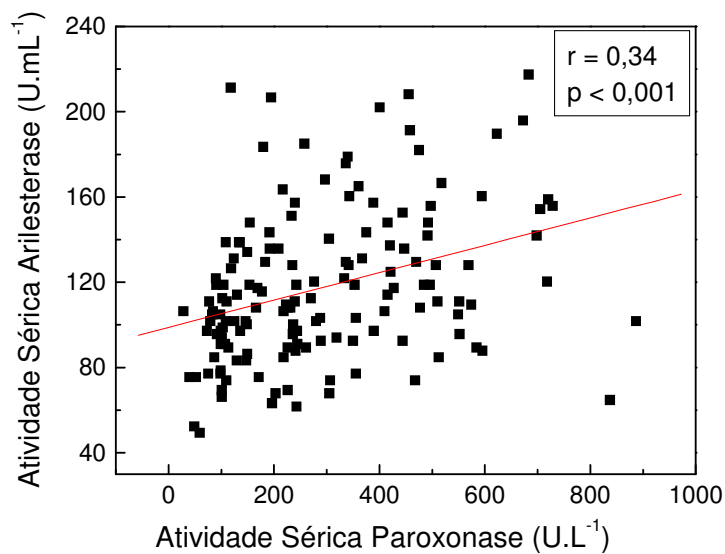


Figura 7. Correlação entre a atividade arilesterase e paroxonase da PON no soro (Correlação de Pearson).

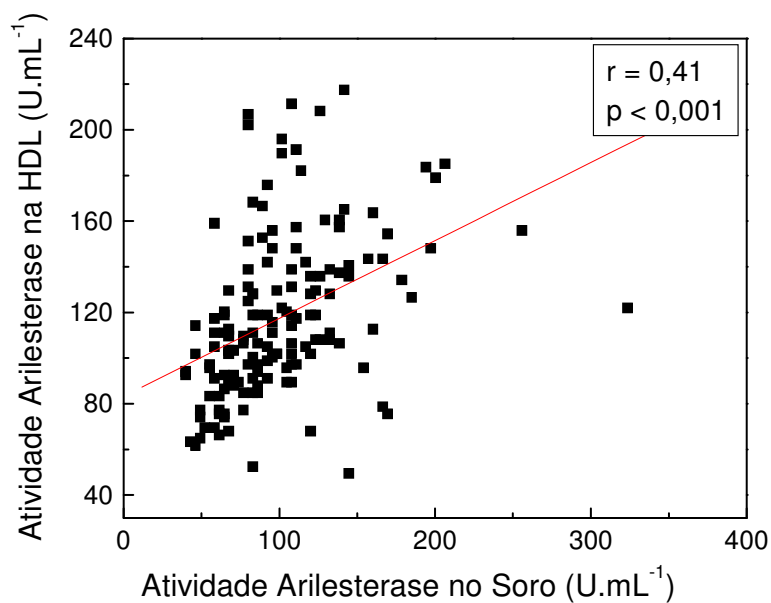


Figura 8. Correlação entre a atividade arilesterase da PON no soro e na HDL isolada (Correlação de Pearson).

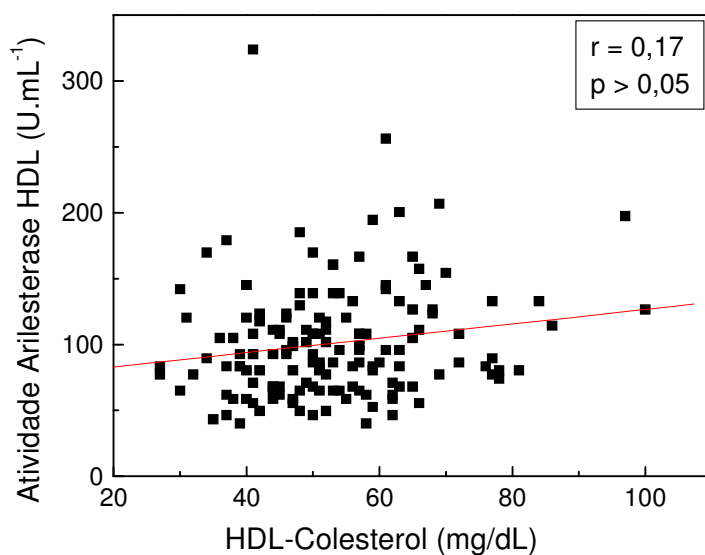


Figura 9. Correlação entre a atividade arilesterase da PON na HDL isolada e a concentração de HDL-C no soro (Correlação de Pearson).

Considerando a importância do tabagismo na atividade da PON, os participantes foram estratificados de acordo com o hábito de fumar em tabagistas, ex-tabagistas (independente do tempo de cessação do hábito) e não-tabagistas. Os resultados da Tabela 6 mostram os valores da atividade da PON em cada grupo. Não foram observadas diferenças significativas intra ou inter-grupos nas atividades da PON com os dois diferentes substratos para os participantes fumantes, ex-fumantes e não-fumantes.

Tabela 6. Atividade enzimática sérica da PON nos participantes dos grupos controle e hipercolesterolêmico, segundo o hábito de fumar

	<i>Controle</i>	<i>Hipercolesterolêmi co</i>	<i>Controle + Hipercolesterolêmi co</i>
Atividade Paroxonase (U/L)			
Fumante	237,71 ± 217,00 (n = 9)	210,36 ± 149,13 (n = 7)	225,7 ± 184, 9 (n = 16)
Ex-fumante	310,46 ± 182,69 (n = 16)	311,31 ± 215,31 (n = 17)	310,9 ± 197,0 (n = 33)
Não-fumante	289,98 ± 202,46 (n = 57)	312,98 ± 167,91 (n = 43)	299,8 ± 187,8 * (n = 100)
Atividade Arilesterase (U/mL)			
Fumante	103,48 ± 23,68	111,68 ± 35,31	
Ex-fumante	99,55 ± 29,30	125,54 ± 43,26	
Não-fumante	119,46 ± 37,29	123,07 ± 32,11	

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão. * p = 0,079 comparado ao grupo fumante (teste de Mann-Whitney).

4.4. Associação entre Polimorfismo e Atividade Enzimática da Paroxonase e entre Polimorfismo e Perfil Lipídico

4.4.1. Influência do polimorfismo PON1-55 na atividade enzimática e no perfil lipídico

As relações entre o polimorfismo PON1-55 e as atividades paroxonase e arilesterase da PON no soro dos indivíduos do grupo controle e dos pacientes hipercolesterolêmicos estão mostradas na Figura 10 e Tabela 7, respectivamente. A atividade paroxonase foi maior nos indivíduos e pacientes portadores do genótipo LL em comparação com o genótipo MM ($p < 0,01$), enquanto que os participantes heterozigóticos LM apresentaram atividade paroxonase intermediária ($MM < LM <$

LL). No entanto, não houve diferença significativa na atividade paroxonase entre controles e hipercolesterolêmicos para os diferentes genótipos (Figura 10). A atividade arilesterase nos pacientes hipercolesterolêmicos portadores do genótipo MM foi menor em comparação com os pacientes de genótipo LL. Não houve diferenças significativas em relação aos genótipos da PON1-55 no grupo controle (Tabela 7).

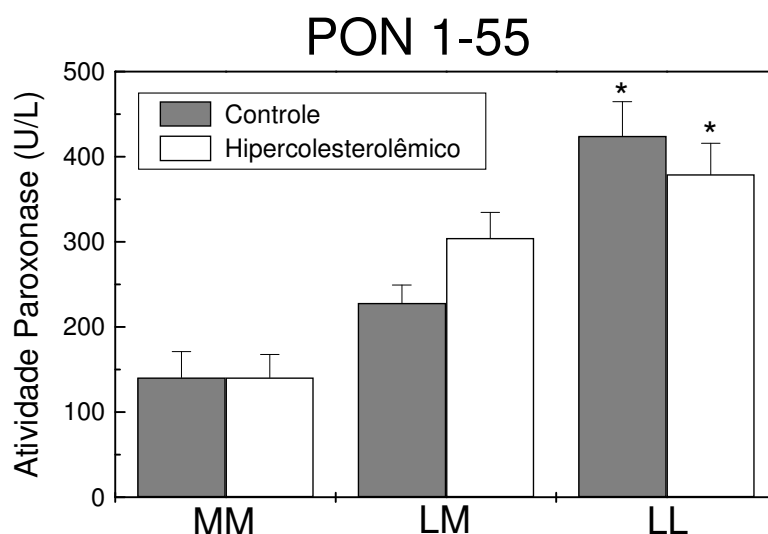


Figura 10. Atividade paroxonase sérica para os grupos controle e hipercolesterolêmico de acordo com o polimorfismo PON1-55. Os valores estão expressos como média \pm erro-padrão da média. U = unidade de enzima ($\mu\text{mol/L}$). * $p < 0,05$ comparado ao genótipo MM do respectivo grupo (Kruskal-Wallis). Controle MM, $n = 13$; LM, $n = 39$; LL, $n = 30$. Hipercolesterolêmicos MM, $n = 12$; LM, $n = 31$; LL, $n = 24$.

Os resultados das relações entre os genótipos do polimorfismo PON1-55 e as concentrações dos lipídeos séricos nos indivíduos do grupo controle e nos pacientes do grupo de estudo estão apresentadas na Tabela 8. O polimorfismo PON1-55 não apresentou efeito significativo no perfil lipídico sérico dos participantes de ambos os grupos. A elevação no colesterol total e LDL-C verificada nos pacientes hipercolesterolêmicos não esteve associada aos genótipos da PON1-55 (Tabela 8).

4.4.2. Influência do polimorfismo PON1-192 na atividade enzimática e no perfil lipídico

O polimorfismo PON1-192 modificou a atividade paroxonase da PON no soro dos indivíduos do grupo controle (Figura. 11). Nesses indivíduos a atividade da PON foi significativamente maior no genótipo RR em relação aos genótipos QR e QQ ($p < 0,001$). Os pacientes hipercolesterolêmicos

portadores do genótipo RR também apresentaram elevada atividade paroxonase; no entanto, não houve diferença significativa devido ao pequeno número de indivíduos com esse genótipo ($n = 2$). O polimorfismo PON1-192 não afetou a atividade arilesterase em indivíduos do grupo controle, mas os pacientes hipercolesterolêmicos portadores do genótipo QQ tiveram menor atividade em relação aos pacientes com genótipo QR ($p < 0,05$) (Tabela 7).

O polimorfismo PON1-192 não afetou o perfil lipídico dos indivíduos do grupo controle ou dos pacientes hipercolesterolêmicos (Tabela 10).

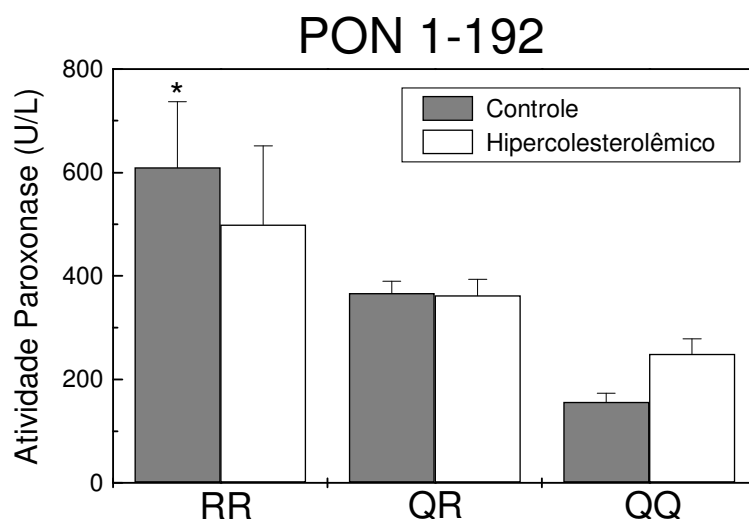


Figura 11. Atividade paroxonase sérica para os grupos controle e hipercolesterolêmico de acordo com o polimorfismo PON1-192. Os valores estão expressos como média \pm erro-padrão da média. U = Unidade de enzima ($\mu\text{mol/L}$). * $p < 0,001$ comparado aos genótipos QR e QQ do mesmo grupo (Teste de Mann-Whitney). Controle RR, $n = 9$; QR, $n = 32$; QQ, $n = 41$. Hipercolesterolêmicos RR, $n = 2$; QR, $n = 30$; QQ, $n = 35$.

4.4.3. Influência do polimorfismo PON2-311 na atividade enzimática e no perfil lipídico

Os resultados da associação entre o polimorfismo PON2-311 e as atividades paroxonase e arilesterase da PON estão mostrados na Figura 12 e Tabela 7, respectivamente. Nos indivíduos do grupo controle, a atividade sérica paroxonase foi maior no genótipo CC, seguida pelo genótipo CS e pelo genótipo SS. Por outro lado, nos pacientes hipercolesterolêmicos, o genótipo CC apresentou a mais baixa atividade em comparação com os demais genótipos do mesmo grupo ($p < 0,05$). Nesses pacientes com o genótipo CC, a atividade paroxonase também foi significativamente menor em comparação com a atividade da PON nos indivíduos

CC do grupo controle ($p < 0,05$; Figura 12). A atividade arilesterase da PON foi significativamente menor nos pacientes hipercolesterolêmicos CC em relação aos pacientes com genótipo SS e aos indivíduos do grupo controle com genótipo CC (Tabela 7). No grupo controle, a atividade arilesterase foi semelhante para os diferentes genótipos (Tabela 7).

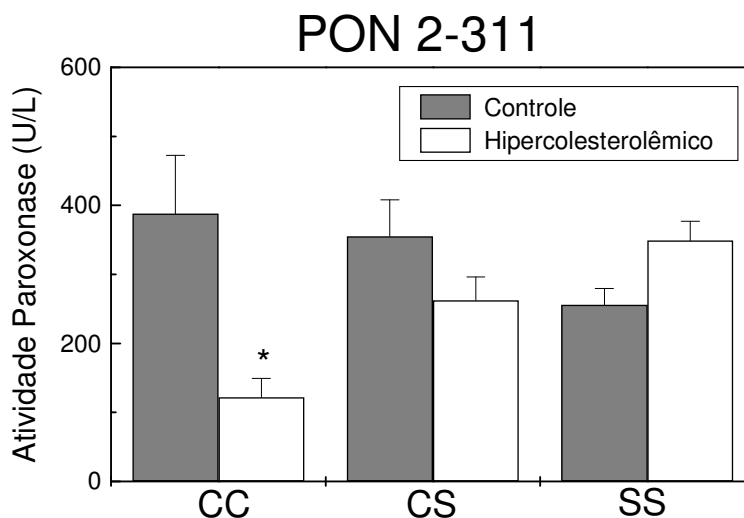


Figura 12. Atividade paroxonase sérica para os grupos controle e hipercolesterolêmico de acordo com o polimorfismo PON2-311. Os valores estão expressos como média \pm erro-padrão da média. U = Unidade de enzima ($\mu\text{mol/L}$). * $p < 0,05$ comparado ao genótipo CC do grupo controle e aos genótipos CS e SS do grupo hipercolesterolêmico (Teste de Kruskal-Wallis). Controle CC, $n = 5$; CS, $n = 20$; SS, $n = 57$. Hipercolesterolêmico CC, $n = 7$; CS, $n = 18$; SS, $n = 42$.

Os resultados do efeito do polimorfismo PON2-311 nas concentrações dos lipídeos séricos estão apresentados na Tabela 10. O polimorfismo PON2-311 não afetou a concentração de lipídeos séricos nos indivíduos do grupo controle ou nos pacientes hipercolesterolêmicos. A elevação nos níveis de colesterol total e LDL-C apresentada pelos pacientes hipercolesterolêmicos foi independente dos genótipos do polimorfismo PON2-311 (Tabela 10).

Tabela 7. Atividade arilesterase da PON (U/mL) em indivíduos do grupo controle e pacientes hipercolesterolêmicos de acordo com os genótipos dos polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311

	Controle			Hipercolesterolêmico		
	MM	LM	LL	MM	LM	LL
PON1-55						
	96,79 ± 27,57 (n = 13)	107,41 ± 31,07 (n = 39)	128,19 ± 38,84 (n = 30)	89,69 ± 13,34*** (n = 12)	111,42 ± 47,15 (n = 31)	144,69 ± 34,27 (n = 24)
PON1-192	RR	QR	QQ	RR	QR	QQ
	113,08 ± 4,23 (n = 9)	120,52 ± 37,50 (n = 32)	108,77 ± 32,50 (n = 41)	144,18 ± 27,26 (n = 2)	136,62 ± 35,57 (n = 30)	109,17 ± 30,27# (n = 35)
PON2-311	CC	CS	SS	CC	CS	SS
	154,81 ± 24,54 (n = 5)	132,61 ± 42,43 (n = 20)	103,64 ± 27,80 ** (n = 57)	86,13 ± 9,27 * (n = 7)	113,08 ± 29,40 (n = 18)	132,61 ± 35,39 (n = 42)

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. U = unidade de enzima, igual à quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de acetato de fenila por minuto, por mililitro de soro. * p < 0,01 comparado ao genótipo CC do grupo controle e ao genótipo SS do grupo hipercolesterolêmico; ** p < 0,01 comparado ao genótipo CC do grupo controle e ao genótipo SS do grupo hipercolesterolêmico; *** p < 0,05 comparado ao genótipo LL do grupo hipercolesterolêmico; # p < 0,05 comparado ao genótipo QR do grupo hipercolesterolêmico (Teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 8. Concentrações séricas de lipídeos de acordo com os genótipos do polimorfismo PON1-55 nos indivíduos do grupo controle e pacientes do grupo hipercolesterolêmico

Parâmetros	Controle			Hipercolesterolêmico		
	MM	LM	LL	MM	LM	LL
Lipídicos	(n=13)	(n=39)	(n=30)	(n=12)	(n=31)	(n=24)
Col. Total (mg/dL)	209,5 ± 19,6	201,5 ± 26,3	202,1 ± 28,3	267,2 ± 31,5 *	281,9 ± 71,7 *	268,3 ± 39,3 *
TG (mg/dL)	149,1 ± 117,1	159,9 ± 81,1	157,4 ± 102,6	164,2 ± 97,6	257,3 ± 295,1	188,9 ± 170,4
HDL-C (mg/dL)	52,6 ± 13,9	49,1 ± 10,8	54,6 ± 13,9	52,7 ± 14,3	54,2 ± 12,7	56,1 ± 15,2
LDL-C (mg/dL)	127,0 ± 13,9	120,4 ± 21,9	116,1 ± 29,1	181,7 ± 26,9 *	176,3 ± 45,1 *	174,5 ± 30,9 *

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. * p<0,01 comparado aos respectivos genótipos do grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 9. Concentrações séricas de lipídeos de acordo com os genótipos do polimorfismo PON1-192 nos indivíduos do grupo controle e pacientes do grupo hipercolesterolêmico

	Controle			Hipercolesterolêmico		
	QQ	QR	RR	QQ	QR	RR
	(n=41)	(n=32)	(n=9)	(n=35)	(n=30)	(n=2)
Col. Total (mg/dL)	207,9 ± 20,9	197,5 ± 32,7	199,4 ± 12,4	275,7 ± 62,7 *	278,2 ± 44,5 *	269,5 ± 56,8
TG (mg/dL)	162,4 ± 100,7	151,2 ± 92,0	150,1 ± 75,9	251,7 ± 280,5	181,6 ± 156,5	218,5 ± 235,2
HDL-C (mg/dL)	51,5 ± 12,5	52,3 ± 13,8	50,7 ± 9,1	54,0 ± 13,9	55,2 ± 14,2	56,0 ± 14,1
LDL-C (mg/dL)	124,0 ± 18,5	114,9 ± 30,4	118,7 ± 15,4	171,5 ± 26,8 *	186,7 ± 43,9 *	173,4 ± 38,9

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. * p < 0,01 comparado aos respectivos genótipos do grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 10. Concentrações séricas de lipídeos de acordo com os genótipos do polimorfismo PON2-311 nos indivíduos do grupo controle e pacientes do grupo hipercolesterolêmico

	Controle			Hipercolesterolêmico		
	CC (n=5)	CS (n=20)	SS (n=57)	CC (n=7)	CS (n=18)	SS (n=42)
Col. Total (mg/dL)	204,6 ± 11,9	214,2 ± 14,8	198,8 ± 28,6	270,0 ± 26,4 *	268,7 ± 39,5 *	277,6 ± 64,8 *
TG (mg/dL)	136,4 ± 39,2	191,5 ± 107,8	146,2 ± 90,3	166,0 ± 108,3	242,7 ± 173,7	213,1 ± 264,7
HDL-C (mg/dL)	54,0 ± 7,2	50,9 ± 16,9	51,8 ± 11,3	59,3 ± 10,9	49,3 ± 12,9	56,1 ± 14,2
LDL-C (mg/dL)	123,3 ± 8,6	125,0 ± 24,7	117,7 ± 24,3	177,5 ± 17,5 *	170,8 ± 27,5 *	179,0 ± 43,0 *

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. * p < 0,01 comparado aos respectivos genótipos do grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis).

5. DISCUSSÃO

Os resultados de vários estudos epidemiológicos têm demonstrado uma forte correlação inversa entre a elevada concentração plasmática de HDL e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Dentre os fatores de risco para a aterosclerose, a baixa concentração plasmática de HDL é considerada um dos mais importantes. Por exemplo, para qualquer concentração de LDL, a concentração de HDL-colesterol está inversamente relacionada com o risco para as doenças cardiovasculares e para o acidente vascular cerebral (CASTELLI e cols., 1986; ASSMANN e cols., 1996; TAMME e cols., 1997).

Muitas linhas de evidência têm enfatizado o papel da modificação oxidativa da LDL no início e na progressão da aterosclerose (hipótese oxidativa). Nessa hipótese, a LDL sofre reações de lipoperoxidação, mediadas por espécies reativas de oxigênio e/ou de nitrogênio, possivelmente no espaço sub-endotelial das artérias. Os aldeídos gerados durante as reações de lipoperoxidação ligam-se aos grupamentos amino dos resíduos de lisina da apolipoproteína B da LDL. A LDL oxidada é captada pelos macrófagos através de endocitose mediada pelos receptores “scavengers”, os quais reconhecem a apo B “modificada”. Esses receptores não sofrem hiporegulação pelo conteúdo intracelular de colesterol e, assim, os macrófagos se transformam em células espumosas, que são os principais constituintes das lesões ateroscleróticas iniciais (estrias gordurosas) (GRAHAM e cols., 1997; KÁDÁR e GLASZ, 2001). Além disso, durante a fase inicial e de progressão das lesões, a LDL oxidada e os macrófagos provocam uma gama de reações de caráter inflamatório, que comprometem a integridade do endotélio vascular e aumentam o tamanho das lesões (ROSS, 1993; SOZMEN e cols., 2001).

O transporte reverso do colesterol tem sido o principal mecanismo bioquímico utilizado para descrever o efeito protetor da HDL contra o desenvolvimento das doenças cardiovasculares. No entanto, o potencial da HDL para impedir diretamente alguns dos processos fundamentais da aterogênese tem recebido grande atenção, como por exemplo, a sua habilidade para limitar a modificação oxidativa da LDL (MACKNESS e DURRINGTON, 1995). A observação de que a HDL é capaz de inibir a oxidação da LDL *in vitro*, descrita inicialmente por Klimov e cols. (1987), levou a conclusões sobre a ação anti-aterogênica da HDL, uma vez que esta propriedade pode estar relacionada, pelo menos em parte, à habilidade de proteger a LDL das modificações que a tornam aterogênica. Posteriormente, outros autores publicaram resultados semelhantes e demonstraram que o efeito protetor da HDL apresentava uma condição de saturação, que sugere um mecanismo enzimático (MACKNESS e DURRINGTON, 1995). Essa atividade parece ser realmente devida à presença de uma ou mais enzimas, pois ao contrário de outros antioxidantes bloqueadores da cadeia de reação de lipoperoxidação, a HDL previne o acúmulo de peróxidos lipídicos na LDL e nas lesões ateroscleróticas por várias horas (MACKNESS e cols., 1991a; AVIRAN e cols., 2000), continuando a exercer o efeito mesmo após a depleção dos antioxidantes lipofílicos da LDL. A enzima paroxonase parece ser a principal responsável pela atividade antioxidante da HDL. Mackness e cols. (1991a) relataram que a PON inibiu a oxidação da LDL induzida por cobre,

fornecendo a primeira hipótese molecular de um mecanismo específico para a proteção da oxidação da LDL pela HDL. Subseqüentemente, Navab e cols. (1997) descreveram a capacidade da PON em remover fosfolípidos oxidados da LDL. Surgiu, assim, a hipótese de que a PON poderia alterar o risco da DAC por proteger a LDL contra a oxidação *in vivo* (HEINECKE e LUSIS, 1998).

O interesse pela PON no contexto da aterosclerose surgiu após os relatos de que a atividade sérica da enzima estava diminuída em pacientes que tinham sofrido infarto do miocárdio (McELVEEN e cols., 1986). Estudos posteriores indicaram que a atividade da PON também estava diminuída em pacientes com hipercolesterolemia familiar e com diabetes mellitus tipo 1 (MACKNESS e cols., 1991b; LEUS e cols., 2001; SENTÍ e cols., 2001). Ambas as condições apresentam uma susceptibilidade aumentada para o desenvolvimento da aterosclerose, indicando uma provável relação entre a PON e a aterosclerose e, possivelmente, um envolvimento da PON nas propriedades antiaterogênicas da HDL.

A baixa atividade da PON e a incidência de DAC têm sido associadas aos polimorfismos da enzima, apesar de algumas inconsistências (JARVIK e cols., 2000; LI e cols., 2003). Caso essas associações se confirmem, poderá haver uma opção adicional de ensaios laboratoriais para melhorar a previsão do desenvolvimento da aterosclerose em grupos de risco, como os pacientes hipercolesterolêmicos. Considerando a falta de informações sobre esse tema em nosso meio, analisou-se a distribuição genotípica e a variação alélica dos polimorfismos PON1-192, PON1-55 e PON2-311 da paroxonase em pacientes hipercolesterolêmicos, bem como a atividade enzimática, o perfil lipídico e o efeito dos polimorfismos da PON nesses parâmetros.

Verificou-se que não houve diferença significativa na distribuição gênica e na frequência alélica dos polimorfismos da enzima PON entre os indivíduos do grupo controle e os pacientes hipercolesterolêmicos ($p > 0,05$). Os participantes de ambos os grupos foram caucasianos com grande influência de imigrantes europeus, principalmente alemães e italianos. Em ambos os grupos, os alelos de maior frequência foram o PON1-55 L, aproximadamente 60 % (Tabela 3), o alelo PON1-192 Q, aproximadamente 70 % (Tabela 4) e o alelo PON2-311 S, aproximadamente 80 % (Tabela 5). Os resultados estão de acordo com outros estudos (SANGHERA e cols., 1998; BOEMI e cols., 2001; BROPHY e cols., 2001; LEUS e cols., 2001; FERRÉ e cols., 2003) e, inclusive, semelhantes à distribuição encontrada na população caucasiana brasileira (ALLEBRANT e cols., 2002). Esses autores relataram a presença de diferenças significativas entre a frequência alélica dos polimorfismos PON1-55 e PON1-192 nos afro-brasileiros em comparação com euro-brasileiros saudáveis, confirmando a importância da influência dos grupos étnicos nos polimorfismos. Na raça negra brasileira, o percentual de portadores do genótipo

PON1-192 QQ e PON1-55 MM foi inferior aos caucasianos (ALLEBRANDT e cols., 2002). Resultados semelhantes foram publicados em outros países, demonstrando que as frequências alélicas da PON variam entre as populações humanas (HU e cols., 2003; LI e cols., 2003; DRAGANOV e LA DU, 2004). Em relação ao polimorfismo PON2-311, não existem relatos para a população brasileira, de qualquer maneira, os resultados do obtidos no presente trabalho estão semelhantes aos publicados por Leus e cols. (2001).

Como mencionado acima, as distribuições dos polimorfismos PON1-55 e PON1-192 são significativamente diferentes entre negros e brancos. A frequência do alelo PON1-55 M é maior em brancos do que em negros, enquanto o alelo PON1-192 R tem comportamento inverso (LI e cols., 2003; DRAGANOV e LA DU, 2004). A menor frequência do alelo PON1 55 M e, a relativa alta frequência do alelo PON1 192 R também ocorrem em chineses e japoneses, variando de 58 a 65 %. Segundo Brophy e cols. (2001), as frequências dos alelos Q/R diferem de acordo com as diferentes regiões geográficas e étnicas no mundo. Assim, o alelo R é mais freqüente na África Central e em algumas populações geneticamente isoladas (HEGELE, 1999), enquanto que o alelo Q é mais freqüente em regiões temperadas da Europa e América do Norte (DRAGANOV e LA DU, 2004).

Vários autores têm procurado relacionar os polimorfismos da paroxonase com a DAC, mas existem muitos resultados contraditórios. Os genótipos PON1-192 RR e PON1-55 LL foram positivamente associados com a aterosclerose em pacientes diabéticos tipo 2 (GARIN e cols., 1997; HU e cols., 2003). No entanto, Rontu e cols. (2003) demonstraram que portadores do genótipo MM tinham um percentual maior de estrias gordurosas nas coronárias do que os pacientes LL, enquanto a associação dos genótipos deixou de existir com lesões ateroscleróticas maduras, sugerindo, assim, que o efeito do genótipo pode ter maior importância nas fases iniciais da aterogênese. Em pacientes com hipercolesterolemia familiar, o polimorfismo PON2-311 foi associado às manifestações clínicas da DAC, enquanto os polimorfismos PON1-55 e PON1-192 não estiveram relacionados. Os portadores do genótipo PON2-311 SS apresentaram maior risco e os pacientes e indivíduos CC parecem estar protegidos contra o desenvolvimento de DAC precoce (Leus e cols., 2001). Sanghera e cols. (1998) também reportaram que o genótipo 311 SS da PON2 esteve associado com a DAC, entretanto, não conseguiram esclarecer se este

polimorfismo afeta diretamente a suscetibilidade para a DAC ou age modificando o efeito do polimorfismo PON1-192. Por outro lado, Ferré e cols. (2002) não encontraram diferenças no genótipo e frequências de alelos para os polimorfismos das posições 55 e 192 entre indivíduos saudáveis e pacientes que tiveram infarto agudo do miocárdio. Outros estudos realizados em diferentes grupos étnicos também não encontraram relação significativa entre o polimorfismo PON1-55 e a presença de DAC (LI e cols., 2003).

As etnias parecem exercer uma função maior do que os polimorfismos da PON no desenvolvimento da DAC. Por exemplo, o genótipo Q do polimorfismo PON1-192 predomina na população caucasiana, enquanto que em negros e orientais o genótipo R é mais comum (DRAGANOV e LA DU, 2004). Contudo, a incidência de DAC nessas últimas raças, pelo menos nos seus países de origem, é menor que nos caucasianos (MACKNESS e MACKNESS, 2004). O polimorfismo PON2-311, por exemplo, foi associado com o risco aumentado para a DAC em sul asiáticos (indianos) e chineses, mas não em malaios e caucasianos (SANGHERA e cols., 1998). Recentemente, Wheeler e cols. (2004) publicaram uma meta-análise dos estudos genéticos epidemiológicos existentes até aquela data. Eles investigaram os polimorfismos 55, 108 e 192 da PON1 e o polimorfismo 311 da PON2 e as suas associações com a DAC em 12786 indivíduos controles e 11212 pacientes com DAC. Os autores não encontraram associação significativa em nenhum dos polimorfismos avaliados com a DAC. No entanto, os resultados da meta-análise não consideraram as diferentes etnias e, assim, é possível que os polimorfismos da PON possam ainda representar um fator de risco para a DAC em grupos étnicos particulares. É possível, também, que os polimorfismos da PON produzam efeito no risco para DAC apenas em grupos particulares de pacientes na presença adicional de fatores que têm prevalência diferente entre as populações ao nível mundial (AUBÓ e cols., 2000). Dessa maneira, o possível efeito deletério de alguns polimorfismos da PON pode ser mais expressivo quando uma variante genética e condição oxidativa particular coexistirem. Entre os fatores que podem estar associados, o diabetes mellitus e a hipercolesterolemia familiar, aparecem como grandes candidatos.

Devido às inconsistências dos estudos de associação dos polimorfismos da PON com a DAC, as atenções têm se voltado para a atividade da enzima. A PON

não tem um papel fisiopatológico conhecido, mas sabe-se que é uma enzima envolvida na hidrólise de compostos organofosforados tóxicos e, talvez, na remoção de produtos de peroxidação lipídica. Os achados de menor atividade da PON em grupos particulares de pacientes de alto risco para a DAC e, inclusive, em pacientes que sofreram infarto do miocárdio (JARVIK e cols., 2000; MACKNESS e cols., 2001), têm estimulado a realização de vários estudos na tentativa de demonstrar uma possível relação da atividade da PON com as doenças cardiovasculares. No presente trabalho foi determinada a atividade da PON com dois diferentes substratos, paroxon e acetato de fenila, em indivíduos do grupo controle e pacientes hipercolesterolêmicos de mesma faixa etária. A atividade paroxonase no soro apresentou correlação positiva com a atividade arilesterase (Figura 7), a qual, por sua vez, esteve associada à atividade nas partículas de HDL isoladas (Figura 8). No entanto, não existiu correlação entre a concentração de HDL-C e a atividade arilesterase na HDL (Figura 9). Esses resultados estão de acordo com outros relatos recentemente publicados (AYUB e cols., 1999; KOPPRASCH e cols., 2003; TOMAS e cols., 2004) e confirmam a suposição de que a concentração de HDL não reflete, necessariamente, todo o potencial protetor da lipoproteína, pelo menos em relação à atividade da enzima paroxonase. Baixos níveis séricos da PON ocorrem quando a concentração de HDL está profundamente diminuída, como na doença de Tangier. Porém, quando os níveis de HDL estão moderadamente diminuídos, como por exemplo, no diabetes mellitus ou na hipercolesterolemia familiar, a atividade da PON independe das mudanças na concentração de HDL (AYUB e cols., 1999; SENTÍ e cols., 2001).

As atividades paroxonase e arilesterase da PON foram semelhantes entre os pacientes hipercolesterolêmicos e os indivíduos do grupo controle (Figura 6). Até onde se sabe, não existem outros estudos na literatura com o mesmo tipo de pacientes para comparar os resultados. Mas, em geral, os níveis séricos da PON diferem significativamente entre os indivíduos e essas variações podem ser devido à idade, patologias, medicamentos, dieta, estilo de vida e fatores ambientais, além da variação gênica (LI e cols., 2003; SENTÍ e cols., 2003; SERES e cols., 2004; BOEMI e cols., 2004). A atividade sérica da PON encontra-se diminuída na doença renal e na hipercolesterolemia familiar (LEUS e cols., 2001), em pacientes com complicações vasculares (DRAGANOV e LA DU, 2004) e neurodegenerativas (LI e

cols., 2003). Boemi e cols. (2001) também relataram que a concentração e a atividade da PON estavam diminuídas em pacientes diabéticos tipo 1. No entanto, existem relatos discordantes. Valabhji e cols. (2001) demonstraram que a atividade da paroxonase não foi diferente em pacientes diabéticos tipo 1 quando comparado com pacientes não diabéticos, nem houve correlação com a medida da íntima arterial. Azizi e cols. (2002) também não encontraram diferença nas atividades paroxonase/arilesterase em pacientes não diabéticos com DAC prematura.

O tabagismo também é outra variável relevante na modulação da atividade da PON e tem particular importância como causa ambiental de dano oxidativo. A relação da atividade da PON com a modulação do dano oxidativo faz com que o fumo do cigarro mereça atenção especial, uma vez que existem evidências de que o hábito de fumar pode levar ao aumento da peroxidação lipídica e dos níveis de LDL oxidada. Os presentes resultados demonstraram que os participantes fumantes de ambos os grupos apresentaram tendência à diminuição na atividade paroxonase, aproximadamente 1,4 vezes, em relação aos não-fumantes ($p = 0,079$; Tabela 6). Boemi e cols. (2004) também demonstraram que as atividades arilesterase e paroxonase e a concentração da PON foram menores em pacientes diabéticos fumantes e ex-fumantes em comparação com os que nunca fumaram. Resultados semelhantes foram descritos por James e cols. (2000). A atividade da PON foi significativamente menor em fumantes do que em indivíduos não fumantes. Ex-fumantes tiveram valores comparáveis aos que nunca fumaram. Ex-fumantes que recentemente pararam de fumar (menos de 3 meses) tiveram atividade e concentração comparáveis com fumantes atuais e a recuperação da atividade e concentração da PON coincidiu com a cessação do hábito de fumar (JAMES e cols., 2000). Todos esses resultados são consistentes com a hipótese de que o cigarro modifica a paroxonase sérica e pode aumentar o risco de DAC devido à diminuição na capacidade de proteger as lipoproteínas de modificações oxidativas.

A atividade da PON tem sido afetada pelos polimorfismos da enzima (ADKINS e cols., 1993; HUMBERT e cols., 1993; HEINECKE e LUSIS, 1998; MACKNESS e cols., 2001; FERRÉ e cols., 2002; DRAGANOV e LA DU, 2004). Apesar da ausência de diferenças na distribuição gênica e frequência alélica e na atividade da paroxonase entre os indivíduos do grupo controle e pacientes hipercolesterolêmicos avaliados nesse estudo, foi verificado se os polimorfismos PON1-55, PON1-192 e

PON2-311 afetariam a atividade da paroxonase de forma diferenciada nessas duas populações. Os resultados demonstraram que, tanto os indivíduos do grupo controle quanto os pacientes hipercolesterolêmicos portadores dos genótipos homozigóticos PON1-55 LL e PON1-192 RR apresentaram as maiores atividades da paroxonase quando o paroxon foi utilizado como substrato (Figuras 10 e 11). Esses resultados confirmam os relatos previamente publicados de que os alelos 55 L e 192 R estão associados à maior atividade paroxonase (MACKNESS e cols., 1996; LA DU, 1996; NAVAB e cols., 1997; MACKNESS e cols., 2000; MACKNESS e cols., 2001). O mesmo padrão de resultados pôde ser observado em pacientes que sofreram infarto do miocárdio (FERRÉ e cols., 2002). A atividade da enzima nos pacientes e indivíduos controles portadores dos alelos PON1-55 e PON1-192 aumentou na seguinte ordem: MM < ML < LL e QQ < RQ < RR, respectivamente. Da mesma maneira, Inoue e cols. (2000) e Jarvik e cols. (2000) já sinalizavam que os polimorfismos da PON não estavam envolvidos com a baixa atividade da PON em pacientes diabéticos e em pacientes com aterosclerose, respectivamente.

É interessante notar que os pacientes hipercolesterolêmicos portadores dos genótipos PON1-55 MM e PON1-192 QQ, os quais tiveram a menor atividade de hidrólise do paroxon (Figuras 10 e 11), também apresentaram a menor atividade arilesterase (acetato de fenila como substrato) (Tabela 7). Esses resultados sugerem uma diminuição na concentração da enzima paroxonase apenas nos pacientes hipercolesterolêmicos portadores desses genótipos, tendo em vista que nos indivíduos do grupo controle a atividade arilesterase não foi estatisticamente diferente nos diferentes genótipos. Conforme demonstrado por Mackness e cols., (2001) e James e cols., (2000), a diminuição da atividade arilesterase está associada à diminuição do RNAm e da concentração da enzima PON. Considerando-se que os alelos M e Q estão associados positivamente à hidrólise de peróxidos lipídicos em lesões ateroscleróticas (AVIRAM e cols., 2000) e nas partículas de LDL (MACKNESS e cols., 1998), é possível inferir que, no presente estudo, os pacientes hipercolesterolêmicos portadores dos genótipos PON1-55 MM e PON1-192 QQ podem apresentar maior risco para o desenvolvimento da aterosclerose. Corroborando com essa hipótese estão os achados de Leviev e cols. (1997) que associaram o alelo M com a diminuição da concentração da PON e de Rontu e cols.

(2003), que encontraram maior percentual de lesões ateroscleróticas iniciais (estrias gordurosas) em portadores do genótipo MM.

Em relação à influência dos alelos do polimorfismo PON2-311 na atividade paroxonase da PON, foi demonstrado no presente trabalho que os pacientes hipercolesterolêmicos portadores do alelo CC apresentaram menor atividade que os portadores dos alelos CS e SS e menor atividade paroxonase que os indivíduos CC do grupo controle (Figura 12). A atividade arilesterase também esteve diminuída nesses pacientes portadores do alelo CC (Tabela 7) e, conforme sugerido acima, essa diminuição na atividade pode ser decorrente de uma menor concentração da enzima. Realizando uma pequena análise de combinação dos genótipos verificou-se que, de fato, todos os pacientes hipercolesterolêmicos portadores do genótipo CC também apresentaram os genótipos 55 MM e 192 QQ, ambos com baixa atividade paroxonase e arilesterase (Figuras 10 e 11, Tabela 7). Esses resultados confirmam a nossa hipótese de menor concentração da enzima paroxonase nos pacientes portadores do haplótipo 55 M, 192 Q e 311 C e, considerando-se a hipótese vigente de que a baixa atividade e/ou concentração da PON estaria associada ao maior risco para a DAC, os pacientes hipercolesterolêmicos portadores desse haplótipo 55 M, 192 Q e 311 C estariam sob maior risco. No entanto, Leus e cols. (2001) demonstraram que pacientes com hipercolesterolemia familiar e com aterosclerose estabelecida, eram portadores do genótipo SS, enquanto os portadores do genótipo CC estavam mais protegidos. Tobin e cols. (2004) também reportaram um efeito protetor significativo contra o infarto do miocárdio em pessoas com o haplótipo 55 M, 192 Q e 311 C.

A implicação de todos esses resultados no desenvolvimento da DAC necessita ainda ser estabelecida, pois não existem estudos na literatura consultada sobre a atividade da PON em relação ao polimorfismo PON2-311 ou ao haplótipo 55 M, 192 Q e 311 C. Além disso, não está claro se o polimorfismo PON2 afeta diretamente a susceptibilidade à DAC, ou se atua modificando o efeito do polimorfismo PON1-55 e 192, pois ao contrário do que ocorre com esses polimorfismos, cujo alelo LL/RR afeta a capacidade antioxidante da HDL, o polimorfismo PON2 não modificou a capacidade da HDL em proteger a LDL contra peróxidos lipídicos (MACKNESS e cols., 1999).

Um futuro tema a ser explorado deveria ser a associação dos polimorfismos da PON com a atividade antioxidante da enzima nos vários grupos de risco para a DAC. No entanto, não existem metodologias simples e rotineiras para o isolamento das partículas de HDL, ou purificação da PON, e a subsequente realização do ensaio laboratorial contra peróxidos lipídicos. As metodologias correntes são extremamente laboriosas e caras, dificultando sobremaneira a sua aplicação em grandes estudos populacionais ou na rotina laboratorial. No presente estudo, foi avaliada a atividade antioxidante da HDL, tendo em vista que a HDL isolada por precipitação seletiva das VLDL e LDL manteve a sua atividade arilesterase intacta

(Figura 4). Os resultados demonstraram que a habilidade antioxidante da HDL dos pacientes hipercolesterolêmicos foi semelhante à atividade antioxidante da HDL dos indivíduos do grupo controle (inibição da oxidação, grupo hipercolesterolêmico: $50,2 \pm 9,2$ % vs grupo controle: $48,8 \pm 10,4$ % (resultados não apresentados na seção “Resultados”)), bem como entre os diferentes genótipos dos polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311, contra a peroxidação de lipossomos induzida por íons cobre ou por um azo-composto gerador de espécies reativas (AAPH; hidrocloreto de 2,2-azobis-2-amidinopropano). A atividade antioxidante foi monitorada através da determinação dos hidroperóxidos lipídicos e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico formados na ausência e na presença de HDL. Entretanto, esses resultados devem ser avaliados com cautela, pois as proteínas plasmáticas, principalmente albumina, a qual também possui atividade antioxidante, estão presentes na HDL assim isolada (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Assim, outras formas simples de isolamento da HDL e/ou da PON devem ser introduzidas para a avaliação apropriada da atividade antioxidante da PON nas diferentes situações fisiopatológicas. A quantificação da LDL oxidada através de métodos imuno-enzimáticos vem, aos poucos, tornando-se comum e vários estudos já demonstraram que pacientes diabéticos ou com DAC possuem níveis plasmáticos elevados de LDL oxidada (KOPPRASCH e cols. 2002). No entanto, os níveis de LDL oxidada no plasma de pacientes diabéticos não estiveram associados ao alelo PON1-192 R (KOPPRASCH e cols., 2003). Senti e cols. (2003) observaram maior concentração de peróxidos lipídicos e menor atividade da PON em pacientes hiperlipidêmicos com síndrome metabólica, sugerindo que esses pacientes apresentam maior estresse oxidativo e uma menor capacidade antioxidante, porém não avaliaram a associação com os diferentes polimorfismos. Mackness e Mackness (2004) também vêm enfatizando a necessidade de que sejam realizados mais estudos investigando a hidrólise de peróxidos lipídicos pela PON na DAC. Porém, na ausência de ensaios de rotina baseados nessa hidrólise de peróxidos lipídicos, os estudos deveriam incluir a hidrólise do paraoxon e/ou diazoxon e a concentração da enzima, pois, para esses autores, o fenótipo da PON (atividade e concentração) tem maior importância como preditores para a DAC que o genótipo.

A localização da PON na partícula de HDL é sugestiva de que a enzima pode exercer um importante papel fisiológico no metabolismo lipídico e proteger os

indivíduos contra o desenvolvimento da aterosclerose (MACKNESS e cols., 1989). Esta especulação tem estimulado a realização de muitos estudos nos últimos anos, com especial ênfase ao fato de que a PON pode proteger o tecido vascular contra o dano oxidativo (WATSON e cols., 1995; MACKNESS e cols., 1998; AVIRAM e cols., 1998; AVIRAM e cols., 2000; VAN LENTEN e cols., 2001; KUREMOTO e cols., 2003). Outros autores têm procurado associar os polimorfismos da PON com o perfil lipídico (OMBRES e cols., 1998; HEGELE, 1999; FANELLA e cols., 2000; LEUS e cols., 2001). Os presentes resultados, no entanto, mostraram que nenhum dos polimorfismos avaliados, PON1-55, PON1-192 e PON2-311, afetou a concentração dos lipídeos ou das lipoproteínas plasmáticas nos pacientes hipercolesterolêmicos ou nos indivíduos do grupo controle (Tabelas 8, 9 e 10). Resultados contraditórios podem ser encontrados na literatura. Por exemplo, Ombres e cols. (1998) demonstraram que o polimorfismo PON1-192 influenciou o perfil lipídico plasmático em pacientes com DAC, sendo que o alelo R está associado a menores níveis de lipídeos aterogênicos (lipoproteínas ricas em apo B). Pacientes com hipercolesterolemia familiar portadores do genótipo PON1-55 MM apresentaram melhor perfil lipídico, com baixos valores de colesterol total e LDL-C (Leus e cols., 2001). Em uma população geneticamente isolada devido à crença religiosa, “Alberta Hutterites”, indivíduos portadores do genótipo PON2-311 CC apresentaram valores elevados de colesterol total (BORIGNT e cols., 1998). Leus e cols. (2001) também reportaram diferenças significativas nos níveis de colesterol total e LDL-C em indivíduos normocolesterolêmicos e pacientes com hipercolesterolemia familiar portadores do genótipo PON2-311 CC, os quais apresentaram níveis elevados de colesterol total e LDL-C. No entanto, o genótipo CC foi encontrado somente nos indivíduos do grupo controle e nos hipercolesterolêmicos assintomáticos, sugerindo que este polimorfismo poderia conferir proteção contra a DAC. Até o momento, não foram encontradas explicações para essa observação. Três possíveis mecanismos para a associação dos polimorfismos do gene da PON2 com as variações no perfil de lipoproteínas plasmáticas podem ser considerados (LI e cols., 2003): 1) efeito direto dos polimorfismos no metabolismo e nas concentrações das lipoproteínas (síntese e/ou secreção); 2) efeito do polimorfismo na atividade da PON com ativação ou inibição de enzimas importantes do metabolismo lipídico, como a lipase lipoprotéica ou a lipase hepática, resultando em mudanças nos níveis lipídicos e na

composição das lipoproteínas; e 3) interferência dos alelos em outras mutações funcionais do gene da PON. Entretanto, semelhante aos nossos resultados, outros autores não têm encontrado associação entre os polimorfismos da PON e as lipoproteínas plasmáticas (GARIN e cols., 1997; SCHIMIDT e cols., 1998). Além disso, os resultados de associação dos níveis lipídicos apresentados até o momento são confusos e não condizentes com a atividade da PON frente aos peróxidos lipídicos ou com os polimorfismos presentes em pacientes com DAC.

A disparidade entre os resultados de vários estudos e a inconsistência entre a relação dos polimorfismos genéticos da PON e DAC poderiam ser explicadas por fatores que incluem: 1) interação gene-ambiente; 2) estudos de ponto final; 3) não envolvimento direto da PON em estágios iniciais da DAC, mas somente em estágios tardios; 4) variação genética; e 5) relações ligadas a outras variantes genéticas funcionais (variações comuns em outro lugar da PON1 como na sequência promotora que determina a quantidade de produto a ser expresso pelo gene (HEGELE, 1999, LI e cols., 2003).

Em resumo, considerando os resultados do presente trabalho, podemos sugerir que os polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311 da paroxonase, bem como a atividade da enzima, não estão associados à hipercolesterolemia em pacientes sem manifestações clínicas da aterosclerose. Os polimorfismos da PON também não afetaram o perfil lipídico de indivíduos controles ou pacientes hipercolesterolêmicos. No entanto, a atividade da paroxonase esteve diminuída nos pacientes hipercolesterolêmicos portadores dos genótipos 55 MM, 192 QQ e 311 CC, provavelmente devido à menor concentração da enzima. A realização de estudos prospectivos será necessária para estabelecer a implicação desses achados no desenvolvimento da doença aterosclerótica.

6. CONCLUSÕES

- a) A distribuição gênica e a frequência alélica dos polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311 foi semelhante entre os pacientes hipercolesterolêmicos e os indivíduos do grupo controle;
- b) A atividade paroxonase e arilesterase da enzima paroxonase nos pacientes hipercolesterolêmicos foi semelhante à atividade observada nos indivíduos controles;
A atividade paroxonase foi maior nos portadores dos alelos PON1-55 L e PON1-192 R, independente da presença da hipercolesterolemia;
A atividade paroxonase foi menor nos pacientes hipercolesterolêmicos portadores do genótipo PON2-311 CC;
Os pacientes hipercolesterolêmicos portadores dos genótipos 55 MM, 192 QQ e 311 CC apresentaram menor atividade arilesterase, provavelmente, devido à menor concentração da enzima.
- c) Os genótipos dos polimorfismos PON1-55, PON1-192 e PON2-311 não afetaram os parâmetros do perfil lipídico nos pacientes hipercolesterolêmicos ou nos indivíduos do grupo controle.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A enzima paroxonase parece estar implicada na proteção contra as doenças cardiovasculares. A utilização da determinação da atividade e da concentração da enzima paroxonase na rotina laboratorial, como marcador de risco para as doenças cardiovasculares, requer a realização de grandes estudos prospectivos para a confirmação dos resultados de atividade da PON obtidos até o momento em populações de alto risco ou que já apresentam manifestações clínicas da doença.

Da mesma forma, os resultados apresentados no presente estudo, de menor atividade da paroxonase associada a determinados genótipos para a enzima paroxonase em pacientes hipercolesterolêmicos, deverão ser confirmados com a realização de estudos com a participação de um número maior de pacientes e, posteriormente, com a realização de estudos prospectivos com essa população específica, incluindo a análise do polimorfismo da PON e a determinação da atividade e/ou concentração da enzima.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, C.A.; MACKNESS, M.I.; KUMAR, S.; BOULTON, A.J.; DURRINGTON, P.N. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 15, p. 1812-1818, 1995.

ADKINS, S.; GAN, K.N.; MODY, M.; LA DU, B.N. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. **Am. H. Hum. Genet.**, v. 52, p. 598-608, 1993.

ALLEBRANDT, K.V.; SOUZA, R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in euro- and afro-brazilians. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 180, p. 151-156, 2002.

ASSMANN, G.; SCHULTE, H.; VON HEKARDSTEIN, A.; HUANG, Y. High density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. **Atherosclerosis**, v. 124, p. S11-S20, 1996.

ANTIKAINEN, M.; MURTOMAKI, S.; SYVÄNNE, M. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with risk of coronary artery disease in Finns. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p. 883-885, 1996.

AUBÓ, C.; SENTÍ, M.; MARRUGAT, J.; TOMÁS, M.; VILA, J.; SALA, J.; MASÍÁ, R. Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. **Eur. Heart J.**, v. 21, n. 1, p. 33-38, 2000.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BISGAIER, C.L.; NEWTON, R.S.; PRIMO-PARMO, S.; LA DU, B.N. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions: a possible role for paraoxonase. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 1581-1590, 1998.

AVIRAM, M. Macrophage foam cell formation during early atherogenesis is determined by the balance between pro-oxidants and anti-oxidants in arterial cells and blood lipoproteins. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 1, n. 4, p. 585-94, 1999a.

AVIRAM, M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? **Mol. Med. Today**, v. 5, n. 9, p. 381-6, 1999b.

AVIRAM, M.; HARDAK, E.; VAYA, J.; MAHMOOD, S.; MILO, S.; HOFFMAN, A.; BILLICKE, S.; DRAGANOV, D.; ROSENBLAT, M. Human serum paraoxonase (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. **Circulation**, v. 101, n. 2, p. 2510-2517, 2000.

AYUB, A.; MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; MACKNESS, B.; PATEL, J.; DURREN, P.N. Serum paraoxonase after myocardial infarction. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 330-335, 1999.

AZIZI, F.; RAHMANI, M.; RAISZADEH, F.; SOLATI, M.; NAVAB, M. Association of lipids, lipoproteins, apolipoproteins and paraoxonase enzyme activity with premature coronary artery disease. **Coron. Art. Dis.**, v. 13, n. 1, p. 9-16, 2002.

BOEMI, M.; LEVIEV, I.; SIROLLA, C. e cols. Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. **Atherosclerosis**, v. 155, n. 1, p. 229-35, 2001.

BOEMI, M.; SIROLLA, C.; TESTA, R.; CENERELLI, S.; FUMELLI, P.; JAMES, R.W. Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme, paraoxonase, in type 2 diabetic patients **Diabet. Med.**, v. 21, p. 423-427, 2004.

BORIGHT A. P.; CONNELLY, P. W.; BRUNT, J. H. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in *Alberta Hutterites*. **Atherosclerosis**, v. 139, p. 131-136, 1998.

BROPHY, V.H.; JAMPSA, R.L.; CLENDENNING, J.B.; McKINSTRY L.A.; JARVIK, G.P., FURLONG, C.E. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 68, p. 1428-1436, 2001.

CASTELLI, W.P.; GARRISON, R.J.; WILSON, P.W.; ABBOT, R.D.; KALOUSDIOU, S.; KAMMEL, W.B. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. **JAMA**, v. 256, p. 2835-2838, 1986.

CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A. Cholesterol and steroid metabolism. In: **Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry**. J.B. Lippincott Company, 2 ed., Philadelphia, PA, 1994, cap. 20, p. 205-228.

DANTOINE, T.; DEBORD, J.; MERLE, L.; CHARMES, J.P. De l'intoxication par les composés organophosphorés à l'athérosclérose: rôles de la paraoxonase 1. **Rev. Med. Int.**, v. 24, p. 436-442, 2003.

DRAGANOV, V.; BALUTSOV, M.; LAZAROV, S. Contemporary views on the etiology and pathogenesis of atherosclerosis. **Vutr. Boles**, v. 32, n. 4, p. 25-32, 2000.

DRAGANOV, D.I.; LA DU, B. N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. Naunyn-Schmiedeberg's. **Arch. Pharmacol.**, v. 369, p. 78-88, 2004.

FANELLA, S.; HARRIS, S.B.; YOUNG, T.K.; HANLEY, A.J.; ZINMAN, B.; CONNELLY, P.W.; HEGELE, R.A. Association between PON1 L/M55 polymorphism and plasma lipoproteins in two Canadian aboriginal populations. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 38, p. 413-420, 2000.

FERRÉ, N.; TOUS, M.; PAUL, A.; ZAMORA, A.; VENDERELL, J.J.; BARDAJÍ, A.; CAMPS, J.; RICHARD, C.; JOVEN, J. Paraoxonase Gln-Arg (192) and Leu-Met (55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease **Clin. Biochem.**, v. 35, p. 197-203, 2002.

FERRÉ, N.; CAMPS, J.; FERNÁNDEZ-MALLART, J.; ARIJA, V.; MURPHY, M.M.; CERUELO, S.; BIARNÉS, E.; VILELLA, E.; TOUS, M.; JOVEN, J. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population **Clin. Chem.**, v.49, p. 1491-1497, 2003.

FIELDING, C.J.; FIELDING, P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. **J. Lipid Res.**, v. 36, p. 211-228, 1995.

FRANCIS, G.A. High density lipoprotein oxidation: in vitro susceptibility and potential in vivo consequences. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1483, p. 217-235, 2000.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v. 18, n. 6, 1972.

GAN, K.N.; SMOLEN, A.; ECKERSON, H.W.; LA DU, B. N.; Purification of serum paroxonase/ arylesterase: evidence of one esterase catalysing both activities. **Drug. Metab. Dispos.**, v.19, n.1, p.100-106, 1991.

GARIN, M.C.B.; JAMES, R.W.; DUSSOIX, P.; BLANCHE, H.; PASSA, P.; FROGUEL, P.; RUIZ, J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentration of enzyme: a possible link between the paraoxonase gene and increase risk of cardiovascular disease in diabetes. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 62-66, 1997.

GENSCHEL, L.; SCHMIDT, H.H. HDL metabolism. **Z. Gastroenterol.**, v. 39, n. 4, p. 321-7, 2001.

GIUGLIANO, D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 10, p. 38-44, 2000.

GNASSO, A.; MOTTI, C.; IRACE, C.; DI GENNARO, I.; PUJIA, A.; LETO, E.; CIAMEI, M.; CRIVARO, A.; BERNARDINI, S.; FEDERICI, G.; CORTESE, C. The Arg allele in position 192 of PON1 is associated with carotid atherosclerosis in subjects with elevated HDLs. **Atherosclerosis**, v. 164, p. 289-295, 2002.

GORDON, T.; CASTELLI, W.P.; HJORTLAND, M.C.; KANNEL, W.B.; DAWBER, T.R. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham Study. **Am. J. Med.**, v. 62, p. 707-714, 1977.

GORDON, D.J.; PROBSTFIELD, J.L.; GARRISON, R.J.; NEATON, J.D.; CASTELLI, W.P.; KNOKE, J.D.; JACOBS, D.R. Jr.; BANGDIWALA, S.; TYROLER, H.A. High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. **Circulation**, v. 79, p. 8-15, 1989.

GRAHAM, A.; HASSALL, D.G.; RAFIQUE, S.; OWEN, J.S. Evidence for a paraoxonase-independent inhibition of low-density lipoprotein oxidation by high-density lipoprotein. **Atherosclerosis**, v. 135, p. 193-204, 1997.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2nd ed., Oxford: Clarenton Press, 1999.

HEGELE, R.A. Paraoxonase, genes and disease. **Ann. Med.**, v. 31, n. 3, p. 217-224, 1999.

HEINECKE, J.W.; LUSIS, A.J. Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis? **Am. J. Hum. Genet.**, v. 62, p. 20-24, 1998.

HONG, S.H.; SONG, J.; MIN, W.K.; KIM, J.Q. Genetic variations of the paraoxonase gene in patients with coronary artery disease. **Clin. Biochem.**, v. 34, n. 6, p. 475-81, 2001.

HU, Y; TIAN, H.; LIU, R. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase 1 is associated with carotid intima-media thickness in patients of type 2 diabetes mellitus of Chinese **Diab. Res. Clin. Pract.**, v. 61, p. 21-27, 2003.

HUMBERT, R.; ADLER, D.A.; DISTECHE, C.M.; HASSETT, C.; OMIECINSKI, C.J.; FURLONG, C.E. The molecular bases of human serum paraoxonase activity polymorphism. **Nat. Genet.**, v. 3, p. 73-76, 1993.

ICCMB - International Congress of Clinical Molecular Biology. Standardization and Quality Control of Molecular Biological Techniques in Clinical Laboratory. Firenze, Italy, 6-11 June, 1999. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 37, p. S35-S37, 1999.

INOUE, M.; SUEHIRO, T.; NAKAMURA, T.; IKEDA, Y.; KUMON, Y.; HASHIMOTO, K.; Serum arylesterase/diazoxonase activity and genetic polymorphisms in patients with type 2 diabetes. **Metabolism**, v. 49 n.11, p.1400-1405, 2000.

JAMES R.W.; LEVIEV I.; RIGHETTI, A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 101, p. 2252-2257, 2000.

JARVIK, G.P.; ROZEK, L.S.; BROPHY, V.H.; HATSUKAMI, T.S.; RICHTER, R.J.; SCHELLEMBERG, G.D.; FURLONG, C.E. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1₁₉₂ or PON1₅₅ genotype **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. 2441-2447, 2000.

JARVIK, G.P.; TSAI, N.T.; MCKINSTRY, L.A.; WANI, R.; BROPHY, V.H.; RICHTER, R.J.; SCHELLEMBERG, G.D.; HEAGERTY, P.J.; HATSUKAMI, T.S.; FURLONG, C.E. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 1329-1333, 2002.

KÁDÁR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque biology **Cardiov. Surg.**, v. 9, n.2. p. 109-121, 2001.

KAPLAN, M.; AVIRAM, M. Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 37, n. 8, p.777-87, 1999.

KLEEMOLA, P.; FREESE, R.; JAUHAINEN, M.; PAHLMAN, R.; ALFTHAN, G.; MUTANEN, M. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. **Atherosclerosis**, v. 160, p. 425-432, 2002.

KLIMOV, A.N.; KOZHEMYAKIN, L.A.; PLESKOV, V.M.; ADREEVA, L. Antioxidative effect of high density lipoproteins in the oxidation of low density lipoproteins. **Bull. Exp. Biol. Med.**, v. 103, p. 103-106, 1987.

KOCH, M.; HERING, S.; BARTH, C. Paraoxonase 1 192 Gln/Arg gene polymorphism and cerebrovascular disease: interaction with type 2 diabetes. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v. 109, n. 3, p. 141-5, 2001.

KOPPRASCH, S.; PIETZSCH, J.; KUHLISCH, E.; FUECKER, K.; TEMELKOVKURKTSCHIEV, T.; HANEFELD, M.; KUHNE, H.; JULIUS, U.; GRAESSLER, J. In vivo evidence for Increase Oxidation of Circulating LDL in Impaired Glucose Tolerance. **Diabetes**, v.51, n.10 p.3102-3106, 2002.

KOPPRASCH, S.; PIETZSCH, J.; KUHLISCH, E.; GRAESSLER, J. Lack of association between serum paraoxonase 1 activities and increased oxidized low-density lipoprotein levels in impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes mellitus. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, p. 1711-1716, 2003.

KUREMOTO, K.; WATANABE, Y.; OHMURA, H.; SHIMADA, K.; MOKUNO, H.; DAIDA, H. R/R genotype of human paraoxonase (PON1) is more protective against lipoprotein oxidation and coronary artery disease in Japanese subjects. **J. Atheroscler. Thromb.**, v. 10, n. 2, p. 85-92, 2003.

KWITEROVICH, P.O. J. The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol. **Am. J. Cardiol.**, v. 82, n. 9 A. p. 13Q-21Q, 1998.

LA DU, B.N. Structural and functional diversity of paraoxonases. **Nature Med.**, v. 2, p. 1186-1187, 1996.

LA DU, B.N. Is paraoxonase-3 another HDL-associated protein protective against atherosclerosis? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, p. 467-468, 2001.

LEUS, F.R.; ZWART, M.; KASTELEIN, J.J.P.; VOORBIJ, H.A.M. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. **Atherosclerosis**, v. 154, p. 641-649, 2001.

LEVIEV, I.; NEGRO, F.; JAMES, R.W. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA: an explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, p. 2935-2939, 1997.

LI, W.F.; COSTA, L.G.; RICHTER, R.J.; HAGEN, T.; SHIH, D.; TWARD, A.; LUSIS, A.J.; FURLONG, C.E. Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. **Pharmacogenetics**, v. 10, p. 767-779, 2000.

LI, H.L.; LIU, D.P.; LIANG, C.C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. **J. Mol. Med.**, v. 81, p. 766-779, 2003.

LIBBY, P. Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. **Am. J. Cardiol.**, v.88, n. 12A. p. 3N-8N, 2001.

MACKNESS, M.I. "A"-esterases. Enzymes looking for a role? **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, p. 385-390, 1989.

MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; DURRINGTON, P.N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. **FEBS Lett.**, v. 286, p. 152-154, 1991 (a).

MACKNESS, M.I.; HARTY, B.; BHATNAGAR, D.; WINCOUR, P.H.; ARROL, S.; ISHOLA, M.; DURRINGTON, P.N. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin dependent diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 86, p. 193-199, 1991 (b).

MACKNESS, M.I.; DURRINGTON, P.N. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. **Atherosclerosis**, v. 115, p. 243-253, 1995.

MACKNESS, M.I.; MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; CONNELLY, P.W.; HEGELE, R.A. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 7, p. 69-76, 1996.

MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; TURKIE, W.; DURRINGTON, P.N. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. **FEBS Lett.**, v. 423, p. 57-60, 1998.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, M.I. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. **Lancet**, v. 353, p.468-469, 1999.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; ABUASHIA, B.; BOULTON, A.J.; MACKNESS, M.I. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. **Clin. Sci.**, v. 98, p. 355-363, 2000.

MACKNESS, B.; DAVIES, G.K.; TURKIE, W.; LEE, E.; ROBERTS, D.H.; HILL, E.; ROBERTS, C.; DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, M.I. Paraoxonase status

in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v 21, n. 9, p.1451-7, 2001.

MACKNESS, M.I.; MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N. Paraoxonase and coronary heart disease. **Atheroscl. Supp.**, n. 3, p. 49-55, 2002.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.; MCELDUFF, P.; YARNELL J.; AZAM, N.; WATT, M.; MACKNESS, M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. **Circulation**, v. 107, p. 2775-2779, 2003.

MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, p. 1317-1323, 2004.

MARTINELLI, N.; GIRELLI, D.; OLIVIERI, O. ; STRANIERI, C.; TRABETI, E.; PIZZOLO, F.; FRISO, S.; TENUTI, I.; CHENG, S.; GROW, M.A.; PIGNATTI, P.F.; CORROCHER, R. Interaction between smoking and PON2 Ser₃₁₁Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 34, n.1, p. 14-20, 2004.

McELVEEN, J.; MACKNESS, M.I.; COLLEY, C.M.; PEARD, T.; WARNER, S.; WALKER, C.H. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in serum of patients after myocardial infarction. **Clin. Chem.**, v. 32, p. 671-673, 1986.

MERTENS, A.; HOLVOET, P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. **FASEB J.**, v.15, p. 2073-2084, 2001.

MION, D.; MACHADO, C.A.; GOMES, M.A.M.; NOBRE, F.; KOHLMANN, O.; AMODEO, C.; PRAXEDES, J.N.; PASCOAL, I.; MAGALHÃES, L.C. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 82, supl. IV, 2004.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTHY, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (acessado em junho de 2002).

NAVAB, M.; HAMA-LEVY, S.; VAN LENTEN, B.J.; FONAROW, G.C.; CARDINEZ, C.J.; CASTELLANI, L.W.; BRENNAN, M.L.; LUSIS, A.J.; FOGELMAN, AM.; LA DU, B.N. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 2005-2009, 1997.

NAVAB, M.; HAMA, S.Y.; COOKE, C.J.; ANANTHARAMAIAH, G.M.; CHADDHA, M.; JIN, L.; SUBBANAGOUNDER, G.; FAULL, K.F.; REDDY, S.T.; MILLER, N.E.; FOGELMAN, A.M. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. **J. Lipid Res.**, v. 41, p. 1481-1494, 2000.

OMBRES, D.; PANNITTERI, G.; MONTALI, A.; CANDELORO, A.; SECCARECCIA, F.; CAMPAGNA, F. The Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 18, p. 1611-1616, 1998.

PATI, N.; PATI, U. Paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in Indian subjects. **Intern. J. Cardiol.**, v. 66, p. 165-168, 1998.

PFOHL M.; KOCH, M.; ENDERLE, M.D; KUHN, R.; FULLHASE, J.; KARSCH, K.R.; HARING, H.U. Paraoxonase: Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 192, p. 623-627, 1999.

PORTO, C.C. Doenças do coração – Prevenção e tratamento. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998.

RONTU, R.; KARHUNEN, P.J.; ILVESKOSKI, E.; MIKKELSSON, J.; KAJANDER, O; PEROLA, M.; PENTILLÄ, A.; KOIVISTO, A.; LEHTIMÄKI, T. Smoking-dependent association between paraoxonase 1 M/L55 genotype and coronary atherosclerosis in males: an autopsy study. **Atherosclerosis**, v. 171, p. 31-37, 2003.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v. 362 p. 801-809, 1993.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A., MACHADO, M.O. HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.**, v. 44, n. 8, p. 1748-1750, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.R.; MANIATIS, T. Gel electrophoresis of DNA In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Cap. 6, p. 6.3-6.19.

SANGHERA, D.K.; ASTON, C.E.; SAHA, N.; KAMBOH, M.I. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with risk of coronary heart disease. **Am. J. Human Genet.**, v. 62, p. 36-44, 1998.

SANTOS, R.D.; GIANNINI, S.D.; FONSECA, F.H.; MORIGUCHI, E.H.; MARANHÃO, R.C.; LUZ, P.L.; LIMA, J.C.; SALGADO-FILHO, W.; AVEZUM, A.; DUNCAM, B.; LOURES-VALE, A.A.; SANTOS, J.E.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; FONSECA, F.H. III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 77, supl. III, São Paulo, 2001.

SECCHIERO, S.; MUSSAP, M.; ZANINOTTO, M. Serum arylesterase (paraoxonase) activity following myocardial infarction. **Clin. Chem. Acta.**, v. 183, p. 71-76, 1989.

SENTÍ, M.; TOMÁS, M.; MARRUGAT, J.; ELOSUA, R. Paraoxonase 1-192 polymorphism modulates the nonfatal myocardial infarction risk associated with decreased HDLs **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, p. 415-420, 2001.

SENTÍ, M.; TOMÁS, M.; FITÓ, M.; WEINBRENNER, T.; COVAS, M.I.; SALA, J.; MASIÁ, R.; MARRUGAT, J. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, p. 5422-5426, 2003.

SERES, I.; PARAGH, G.; DESCHENE, E.; FULOP, T.; KHALIL, A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging **Exp. Geront.**, v. 39, p. 59-66, 2004.

SCHIMIDT, H.; SCHIMIDT, R.; NIEDERKORN, K. Paraoxonase PON1 polymorphysm Leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian stroke prevention study. **Stroke**, v. 29, p. 2043-2048, 1998.

SORENSEN, R.C.; BISGAIER, C.L.; AVIRAM, M.; HSU, C.; BILLECKE, S. LA DU, B.N. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, n. 9, p. 2214-222, 1999.

SOZMEN, E.Y.; SOZMEN, B.; GIRGIN, F.K. Antioxidant enzymes and paraoxonase show a co-activity in preserving low-density lipoprotein from oxidation. **Clin. Exp. Med.**, v. 1, n. 4, p. 195-9, 2001.

SUTHERLAND, W.H.F.; WALKER, R.J.; JONG, S.A.; VAN RIJ, A.M.; PHILLIPS, V.; WALKER, H.L. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 1340-1347, 1999.

TAMME, D.; YAARI, S.; GOLDBOURT, U. High-density lipoprotein cholesterol and risk of ischaemic stroke mortality. A 21 year follow-up of 8586 men from the Israeli Ischaemic Heart Disease Study. **Stroke**, v. 21, p. 83-87, 1997.

TOBIN, M. D.; BRAUMEL, P. S.; BURTON, P. R.; THOMPSON, J. R.; STEADS, R.; CHANNER, K. Genotypes and haplotypes predisposing to myocardial infarction: a multilocus case-control study. **Eur. Heart J.**, v. 25, p. 459-467, 2004.

TOMAS, M.; LATORRE, G.; SENTI, M.; MARRUGAT, J. The antioxidant function of high density lipoproteins: a new paradigm in atherosclerosis. **Rev. Esp. Cardiol.**, v. 57, n. 6, p. 557-569, 2004.

VALABHJI, J.; McCOLL, A.J.; SCHACHTER, M.; DHANJIL, S.; RICHMOND, W.; ELKELES, R.S. High-density lipoprotein composition and paraoxonase activity in type I diabetes. **Clin. Scien.**, v. 101, p. 659-670, 2001.

VAN LENTEN, B.J.; NAVAB, M.; SHIH, D.; FOGELMAN, A.M.; LUSIS, A.J. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 11, n. 3/4, p. 155-161, 2001.

VOETSCH, B.; BENKE, K.S.; DAMASCENO, B.P.; SIQUEIRA, L.H.; LOSCALZO, J. Paraoxonase 192 Gln-Arg polymorphism an independent risk

factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. **Stroke**, v. 33, p. 1459-1464, 2002.

WATSON, A.D.; BERLINER, J.A.; HAMA, S.Y.; LA DU, B.N.; FAULL, K.F.; FOGELMAN, A.M.; NAVAB, M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 2882-2891, 1995.

WHEELER, J. G.; KEAVNEY, B. D.; WATKINS, H.; COLLINS, R.; DANESH, J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. **Lancet**, v. 363, p. 689-695, 2004.

8. ANEXOS

8.1. Anexo A. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com seres Humanos

8.2. Anexo B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO – TRINDADE
CEP.: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA
TEL.: (048) 331-9712 / 331- 9856 – FAX.: (048) 331-9542

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) senhor (a) está sendo convidado a participar de um estudo, onde pretende-se avaliar a presença do polimorfismo genético da enzima paraoxonase (diferenças na estrutura

da enzima, modificando a sua atividade) em pacientes hipercolesterolêmicos (colesterol elevado).

Este estudo é necessário porque acredita-se que o risco de desenvolver doenças do coração esteja relacionado à presença de diferenças na estrutura da enzima paraoxonase (polimorfismo). Supõe-se que esta enzima seja um dos fatores envolvidos na proteção de doenças do coração.

Precisamos de sua colaboração e autorização para uma coleta de sangue (três tubos) em jejum de 12 horas. Isto traz apenas o desconforto de uma coleta de sangue, mas esperamos que traga benefícios, tais como a possibilidade de conhecimento de novos fatores de risco para doenças do coração.

Esta pesquisa não oferece riscos, não tem fins lucrativos, é confidencial, o seu nome servirá apenas para que você possa receber o resultado do exame. As amostras serão identificadas pelo número do seu cadastro.

O (A) senhor (a) poderá se beneficiar diretamente dos resultados obtidos caso este seja de interesse clínico.

Sua participação é voluntária, podendo desistir desta pesquisa em qualquer de suas fases.

Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelos telefones 99968544 ou 234-8310 (Maria Elisa) ou 3319712 (prof. Edson). Se você estiver de acordo em participar, posso garantir que as informações fornecidas serão confidenciais (ou material coletado) e só serão utilizados neste trabalho.

Eu, abaixo assinado concordo em fornecer amostra de sangue para realização deste estudo.

Nome do paciente

Assinatura

Data

Maria Elisa Favarin
Nome do pesquisador
8544

Assinatura

Tel. Contato: 9996-



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

CAMPUS UNIVERSITÁRIO – TRINDADE

CEP.: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA

TEL.: (048) 331-9712 / 331- 9856 – FAX.: (048) 331-9542

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____,
fui esclarecido sobre a pesquisa Polimorfismo genético da enzima Paraoxonase (PON) em pacientes hipercolesterolêmicos e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, ____ de _____ de 2002.

Assinatura: _____ RG: _____

8.3. Anexo C. Questionário - Avaliação Clínica



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS**

CAMPUS UNIVERSITÁRIO – TRINDADE

CEP.: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA

TEL.: (048) 331-9712 / 331- 9856 – FAX.: (048) 331-9542

Projeto de pesquisa: Polimorfismo da enzima

Paraoxonase

Questionário – Avaliação Clínica

Identificação: Paciente N° _____ Grupo: _____

Nome: _____

N° Protocolo (cadastro) _____

Sexo: masculino feminino Estado civil: _____

Data do nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Peso: _____ Kg Altura: _____ cm IMC: _____

Raça: branco pardo amarelo negro

Descendência: _____

Ocupação: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

Cidade: _____

Estado: _____ Cep.: _____ Telefone: _____

Dados Complementares: _____

Fatores de Risco:

- Hipertensão arterial: sim não
- Diabetes: sim não Última
glicose: _____
- Dislipidemia: sim não
- Histórico Familiar de Diabetes: sim não
Parentesco: _____
- Tabagista: sim não N° cigarros: _____ Passado Parou há: _____
- Antecedentes Familiares da DAC (infarto, AVC): sim não
- Problema respiratório: _____

Antecedentes Morbidades

- Cirurgias: _____
- Internações: _____
- Doenças: _____
- Angina Pectoris: sim não Início: ____/____/____
- Infarto do Miocárdio: Sim Não Data: ____/____/____
- DAC em outro local: Cérebro Periférico Aorta Renal Intestino
- Pés: _____

Hábitos

- Atividade Física: sim não
Frequência: _____
- Bebida Alcoólica: sim não Diário 1-3x semana
Tipo da bebida: _____
- Stress: sim não
- Medicamentos: Frequente sim não
Quais: _____
Insulina: _____ (há quanto
tempo)
- Vitaminas: _____
- Chimarrão: _____

Observações

Para uso do pesquisador:

Bioquímica Data: _____

Glicemia: _____

Hemoglobina glicada: _____

Colesterol Total _____

HDL _____ LDL _____ VLDL _____ Triglicérides _____

Observações _____
